

Aus dem Departement für Nutztiere der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich  
(Direktor Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun)

---

**Infektion von Kälbern, Schafen und Ziegen mit Border-Disease-Virus**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

**Christof Reichert**

Tierarzt

aus Quierschied / Saar (Deutschland)

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun, Referent

Prof. Dr. E. Peterhans, Korreferent

Zürich, 2009

Zentralstelle der Studentenschaft

Meinen lieben Eltern

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BD:	Border-Disease / Border-Krankheit
BDV:	Border-Disease-Virus
BVD:	Bovine Virusdiarrhoe
BVDV:	Bovines Virusdiarrhoe-Virus
CSFV / ESPV:	Classical-Swine-Fever-Virus / Virus der europäischen Schweinepest
EKaNaEp:	embryonales Kälber-Nasenepithel
ELISA:	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
HLP:	Hämolyspuffer
IPO:	Immunperoxidase
LSM:	lamb synovial membrane
MEM:	Earle's minimal essential medium
MOI:	multiplicity of infection
Nr.:	Nummer
ntr:	nicht-translatierte Region
OD:	Optical Density
PCR:	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pi:	persistent infiziert
rt:	real time
RT:	Reverse Transkriptase
RT-PCR:	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SNT:	Serum-Neutralisations-Test
TCID <sub>50</sub> :	Tissue-Culture-Infectious-Dose <sub>50</sub>

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>5</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>6</b>
<b>3. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>7</b>
<b>4. LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>9</b>
4.1. Border-Disease (BD)	9
4.2. Das Border-Disease-Virus (BDV)	9
4.2.1. Geschichtlicher Überblick	9
4.2.2. Taxonomie	9
4.2.3. Struktur	12
4.2.4. Tenazität und Überlebensfähigkeit	12
4.2.5. Speziesspezifität und Interspeziesübertragung	13
4.2.6. Nachweis des Border-Disease-Virus beim Rind	15
4.3. Isolierung, Nachweis und Typisierung oviner Pestiviren	15
4.3.1. Isolierung oviner Pestiviren	15
4.3.2. Nachweis und Typisierung oviner Pestiviren	15
4.4. Epidemiologie der Border-Disease	17
4.4.1. Vorkommen und Verbreitung der Border-Disease	17
4.4.2. Seroepidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung von Pestiviren	17
4.5. Klinik und Pathogenese der Border-Disease	18
4.5.1. Horizontale Virusübertragung	18
4.5.2. Vertikale Virusübertragung, intrauterine Infektion	19
4.5.3. Transiente Infektion	20
4.5.4. Persistente Infektion	21
4.5.5. Late-onset Disease bei persistent infizierten Tieren	21
4.6. Pathologie der Border-Disease	22
4.7. Infektionsversuche mit dem Border-Disease-Virus	23
<b>5. TIERE, MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>26</b>
5.1. Tiergruppen	26
5.1.1. Tiergruppe A: Kälber	26
5.1.2. Tiergruppe B: Ziegen	26
5.1.3. Tiergruppe C: Schafe	26

5.2. Pestivirusstatus der drei Tiergruppen	26
5.3. Herkunft und Kultivierung des zur Infektion verwendeten BD-Virus	27
5.3.1. Herkunft des zur Infektion verwendeten BD-Virus	27
5.3.2. Kultivierung des zur Infektion verwendeten BD-Virus	27
5.4. Untersuchungsort und -zeitraum	28
5.4.1. Haltung der Tiere	28
5.4.2. Untersuchungszeitraum	29
5.5. Untersuchungsphasen	29
5.6. Durchführung der Untersuchungen	30
5.6.1. Durchführung der Infektion	30
5.6.2. Klinische Untersuchungen	30
5.6.3. Entnahme von Nasentupfern	31
5.6.4. Entnahme von Blutproben	31
5.7. Virologische Untersuchungen	32
5.7.1. Nachweis viraler RNA im Blut	32
5.7.2. Nachweis viraler RNA in den Tupferproben	33
5.7.3. Virus-Sequenzierung	33
5.8. Serologische Untersuchungen	34
5.8.1. Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)	34
5.8.2. Serumneutralisation	35
5.9. Hämatologische Untersuchungen	36
5.10. Vorgehen beim Auftreten von erosiven Veränderungen	37
5.11. Statistik	37
5.12. Zusammenarbeit mit anderen Institutionen	38
5.13. Tierversuchsbewilligung	38
<b>6. ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
6.1. Kälber (Tiergruppe A)	39
6.1.1. Klinische Befunde	39
6.1.1.1. Allgemeinzustand, Fresslust und Nährzustand	39
6.1.1.2. Rektale Temperatur	39
6.1.1.3. Herz- und Kreislaufsystem	41
6.1.1.4. Atemapparat	41
6.1.1.5. Haut und Hautanhangsorgane	41
6.1.1.6. Farbe und Veränderungen der Schleimhäute	42
6.1.1.7. Verdauungsapparat	45
6.1.2. Hämatologische Untersuchungsergebnisse	46
6.1.3. Serologische Untersuchung auf Border-Disease	47
6.1.3.1. ELISA	47

6.1.3.2. Serumneutralisationstest	48
6.1.4. Virologische Untersuchungsergebnisse	48
6.1.4.1. Virusnachweis im Blut	48
6.1.4.2. Virusnachweis in Nasentupferproben	49
6.1.4.3. Virusnachweis in Tupferproben von Erosionen	49
6.2. Ziegen (Tiergruppe B)	50
6.2.1. Klinische Befunde	50
6.2.1.1. Allgemeinzustand, Fresslust und Nährzustand	50
6.2.1.2. Rektale Temperatur	50
6.2.1.3. Herz- und Kreislaufsystem	51
6.2.1.4. Atemapparat	52
6.2.1.5. Haut und Hautanhangsorgane	52
6.2.1.6. Farbe und Veränderungen der Schleimhäute	53
6.2.1.7. Verdauungsapparat	54
6.2.2. Hämatologische Untersuchungsergebnisse	54
6.2.3. Serologische Untersuchung auf Border-Disease	55
6.2.3.1. ELISA	55
6.2.3.2. Serumneutralisationstest	56
6.2.4. Virologische Untersuchungsergebnisse	56
6.2.4.1. Virusnachweis im Blut	56
6.2.4.2. Virusnachweis in Nasentupferproben	57
6.2.4.3. Virusnachweis in Tupferproben von Schleimhautveränderungen	57
6.3. Schafe (Tiergruppe C)	58
6.3.1. Klinische Befunde	58
6.3.1.1. Allgemeinzustand, Fresslust und Nährzustand	58
6.3.1.2. Rektale Temperatur	58
6.3.1.3. Herz- und Kreislaufsystem	59
6.3.1.4. Atemapparat	60
6.3.1.5. Maul	60
6.3.1.6. Vulva	60
6.3.1.7. Verdauungsapparat	63
6.3.2. Hämatologische Untersuchungsergebnisse	63
6.3.3. Serologische Untersuchung auf Border-Disease	65
6.3.3.1. ELISA	65
6.3.3.2. Serumneutralisationstest	65
6.3.4. Virologische Untersuchungsergebnisse	66
6.3.4.1. Virusnachweis im Blut	66
6.3.4.2. Virusnachweis in Nasentupferproben	66
6.3.4.3. Virusnachweis in Tupferproben von Schleimhautveränderungen	67

6.4. Änderungen der Leukozyten- und Lymphozytenkonzentrationen während des Untersuchungszeitraums	67
<b>7. DISKUSSION</b>	<b>68</b>
7.1. Übersicht	68
7.2. Tiergruppe A (Kälber)	68
7.2.1. Virusnachweis	68
7.2.2. Serologie	70
7.2.3. Serumneutralisationstest	70
7.2.4. Hämatologie	72
7.2.5. Klinik	72
7.3. Tiergruppe B (Ziegen)	73
7.3.1. Virusnachweis	73
7.3.2. Serologie	74
7.3.3. Serumneutralisationstest	74
7.3.4. Hämatologie	75
7.3.5. Klinik	75
7.4. Tiergruppe C (Schafe)	75
7.4.1. Virusnachweis	75
7.4.2. Serologie	76
7.4.3. Serumneutralisationstest	76
7.4.4. Hämatologie	77
7.4.5. Klinik	77
7.5. Tiergruppenvergleich	77
7.6. Schlussfolgerungen	79
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>81</b>
<b>9. LEBENSLAUF</b>	<b>89</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b>	<b>90</b>

## **1. Zusammenfassung**

Sieben Kälber, sieben Ziegen und acht Schafe wurden peroral mit dem Border-Disease-Virus CH-BD4, das von einem persistent infizierten Schaf stammte, infiziert und über 70 Tage untersucht. Die Infektionsdosis lag bei  $0.2 - 0.7 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>. Die Infektion erfolgte nach einer 17-tägigen Akklimatisationsphase. Während dieser Zeit waren alle Tiere seronegativ und Pestiviren wurden zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen.

Bei 5 Kälbern kam es im Anschluss an die Infektion zu geringgradigen Erosionen der Maulschleimhaut. Sechs Schafe und zwei Ziegen zeigten Veränderungen im Bereich der Vulva. Bei vier Schafen traten erosive Veränderungen im Bereich des Mauls auf.

Die Leukozyten- und Lymphozytenkonzentrationen wiesen keine signifikanten Veränderungen auf.

Bei drei Kälbern wurde im Blut virale RNA gefunden. Antikörper wurden im ELISA bis zum Ende der Untersuchungen bei keinem Kalb nachgewiesen. Im Serumneutralisationstest zeigte ein Kalb geringe Titer neutralisierender Antikörper gegen das BDV. Bei vier Ziegen und zwei Schafen konnte aufgrund eines wiederholten Nachweises viraler RNA und einer deutlichen Serokonversion auf eine erfolgreiche Infektion geschlossen werden. Alle übrigen Schafe und Ziegen blieben seronegativ.



## **2. Summary**

Seven calves, seven goats and eight sheep were inoculated intraorally with  $0.2 - 0.7 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> of Border-Disease-Virus CH-BD4, isolated from a persistently infected sheep. After that they were examined for 70 days. Challenge exposure took place after an acclimatization period of 17 days. During that period, all animals were tested seronegative and pestiviruses were not detected.

After infection five calves showed mild erosive lesions in the mucous membranes of the mouth. Six sheep and two goats showed alterations of different degree in the vulval circumference. Four sheep showed erosive lesions of the mouth.

There were no significant changes either in the leukocyte nor in the lymphocyte concentration in any calf, goat or sheep.

After challenge exposure, viral RNA was detected in the blood samples of three calves. In the calves group, a seroconversion could not be proven in any of the calves by ELISA. However, using the virus neutralization test one calf showed low titres of specific antibodies against BDV. Based on the repeated detection of viral RNA and the clear seroconversion we could conclude a successful infection in four goats and two sheep. All other goats and sheep remained seronegative.

### 3. Einleitung und Zielsetzung

Pestiviren sind in der Wiederkäuerpopulation weit verbreitet. Beim Rind ist es das Bovine-Virus-Diarrhoe-Virus (BVD-Virus) und beim Schaf das Border-Disease-Virus (BD-Virus). Es ist bekannt, dass Pestiviren die Speziesbarrieren durchbrechen können und dass es zu gegenseitigen Infektionen zwischen Rind und Schaf kommen kann (CARLSSON, 1991; CARLSSON und BELÁK, 1994; CAMPBELL et al., 1995; PATON et al., 1997). Die Interspeziesübertragung scheint unter natürlichen Bedingungen in Richtung vom Rind auf das Schaf besonders ausgeprägt zu sein (LØKEN, 1995). Bis anhin wurde davon ausgegangen, dass persistent infizierte Rinder in vielen Gegenden das wichtigste Virusreservoir für Schafe darstellen. Es existieren nur wenige Hinweise, dass die Infektion auch in umgekehrter Richtung vom Schaf auf das Rind übertragen wird (PATON et al., 1997). Im Jahr 2007 wurden in Grossbritannien erstmals 3 Tiere der Rindergattung beschrieben, die persistent mit Border-Disease-Virus infiziert waren (CRANWELL et al., 2007). Beim Tier 1 handelte es sich um ein 13 Monate altes Rind mit Durchfall und Abmagerung, beim Tier 2 um ein 2.5 Jahre altes Rind mit Durchfall und weiteren klinischen Symptomen von Mucosal Disease und beim Tier 3 um ein neugeborenes, kleines und schwaches Kalb, das bald nach der Geburt starb. Da die Seroprävalenz von Border-Disease beim Schaf in der Schweiz beachtlich ist (SCHALLER et al., 2000), ist davon auszugehen, dass auch pi-Tiere existieren, welche die Infektion weiterverbreiten. Im Rahmen des Eradikationsprogrammes von BVD in der Schweiz gewinnt das Schaf als Pestivirus-Infektionsquelle möglicherweise an Bedeutung, vor allem dann, wenn Schafe, Ziegen und Rinder zusammen geweidet, gealpt oder im Stall gehalten werden. Die Bedeutung des Schafes bei der Übertragung von Pestiviren auf das Rind und die Ziege ist deshalb nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, sondern auch von grosser praktischer Relevanz. Sie soll aus diesem Grund im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter abgeklärt werden. Da die klinischen Symptome von akut mit

Border-Disease-Virus infizierten Kälbern, Schafen und Ziegen diskret und kaum bekannt sind, soll darüber hinaus untersucht werden, wie sich eine akute BD-Infektion bei Kälbern, Schafen und Ziegen manifestiert.

Ziel der Dissertation war es, zu untersuchen, ob das Border-Disease-Virus durch eine experimentelle intraorale Infektion mit Virus, welches aus Leukozyten eines persistent mit Border-Disease infizierten Schafes gewonnen und danach in Zellkultur gezüchtet worden war, auf seronegative Kälber, Schafe und Ziegen übertragen werden kann.

Im Einzelnen sollte untersucht werden, ob infizierte Tiere eine transiente Virämie entwickeln und über welchen Zeitraum diese auftritt, ob es bei diesen Tieren zu einer Serokonversion kommt, ob und welche klinischen Symptome bei einer akuten Infektion mit dem Border-Disease-Virus auftreten und zu welchen hämatologischen Veränderungen eine solche Infektion führt.

## **4. Literaturübersicht**

### **4.1. Border-Disease (BD)**

Die Border-Disease (BD) ist das Ergebnis einer kongenitalen Infektion von Schafen und gelegentlich von Ziegen mit dem Border-Disease-Virus (CARLSSON, 1991; THABTI et al., 2002). Betroffene Lämmer zeigen Symptome wie haariges Vlies, klonische Muskelkrämpfe, verzögertes Wachstum, skelettale Missbildungen und Kümern. Die Überlebensraten solcher Neugeborenen sind gering (GARCÍA-PÉREZ et al., 2009).

### **4.2. Das Border-Disease-Virus (BDV)**

#### **4.2.1. Geschichtlicher Überblick**

Ein erster Bericht über die Border-Disease stammt aus der Grenzregion („border regions“) zwischen England und Wales (HUGHES et al., 1959), was der Erkrankung und dem zugrundeliegenden Virus ihren Namen gab. Bald wurde bekannt, dass die Border-Disease auf der ganzen Welt auftritt. Mittlerweile ist sie vielfach beschrieben und es existieren mehrere Übersichtsartikel, welche den neuesten Erkenntnisstand zusammenfassen (LØKEN, 1995; BOSTEDT und DEDIÉ, 1996; NETTLETON et al., 1998; BRAUN et al., 2002). Ursprünglich wurde das Virus der Familie der Togaviridae zugeteilt (SAWYER, 1992). In der Schweiz wurde das Border-Disease-Virus erstmals 2001 isoliert und als CH,<sub>r</sub>1292“(01) bezeichnet (BRAUN et al., 2002).

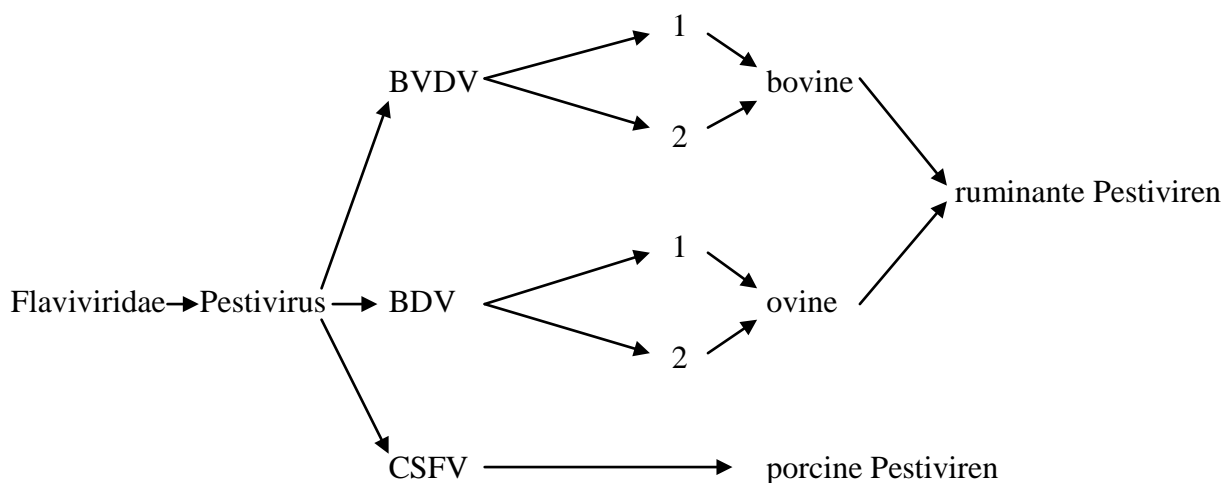
#### **4.2.2. Taxonomie**

Das Border-Disease-Virus (BDV) bildet zusammen mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV), dessen Subtypen 1 und 2 und dem Virus der klassischen bzw. europäischen Schweinepest (CSFV / ESPV) das Genus Pestivirus (Abb.1). Die Genera Pestivirus, Flavivirus und Hepatitis-C-Virus bilden die Familie der Flaviviridae (THABTI et al., 2002).

Neben den klassischen Border-Disease-Virus-Stämmen existiert noch eine Gruppe von Isolaten aus Schafen und Zootieren (Reindeer-1; BECHER et al., 2003; KÖNIG et al., 2003). Die erwähnten Stämme lassen sich von den etablierten Spezies auf der Basis der N<sub>pro</sub>-Sequenz klar differenzieren. Aufgrund ihrer nahen Verwandtschaft zu den klassischen BDV-Stämmen werden sie von KÖNIG et al. (2003) als BDV-2 bezeichnet.

Das Border-Disease-Virus und das Virus der Bovinen-Virus-Diarrhoe bilden die Gruppe der ruminanten Pestiviren. Diese sind wichtige, pathogene Agenzien, welche die Wiederkäuerspezies auf der ganzen Welt infizieren (NETTLETON und ENTRICAN, 1995).

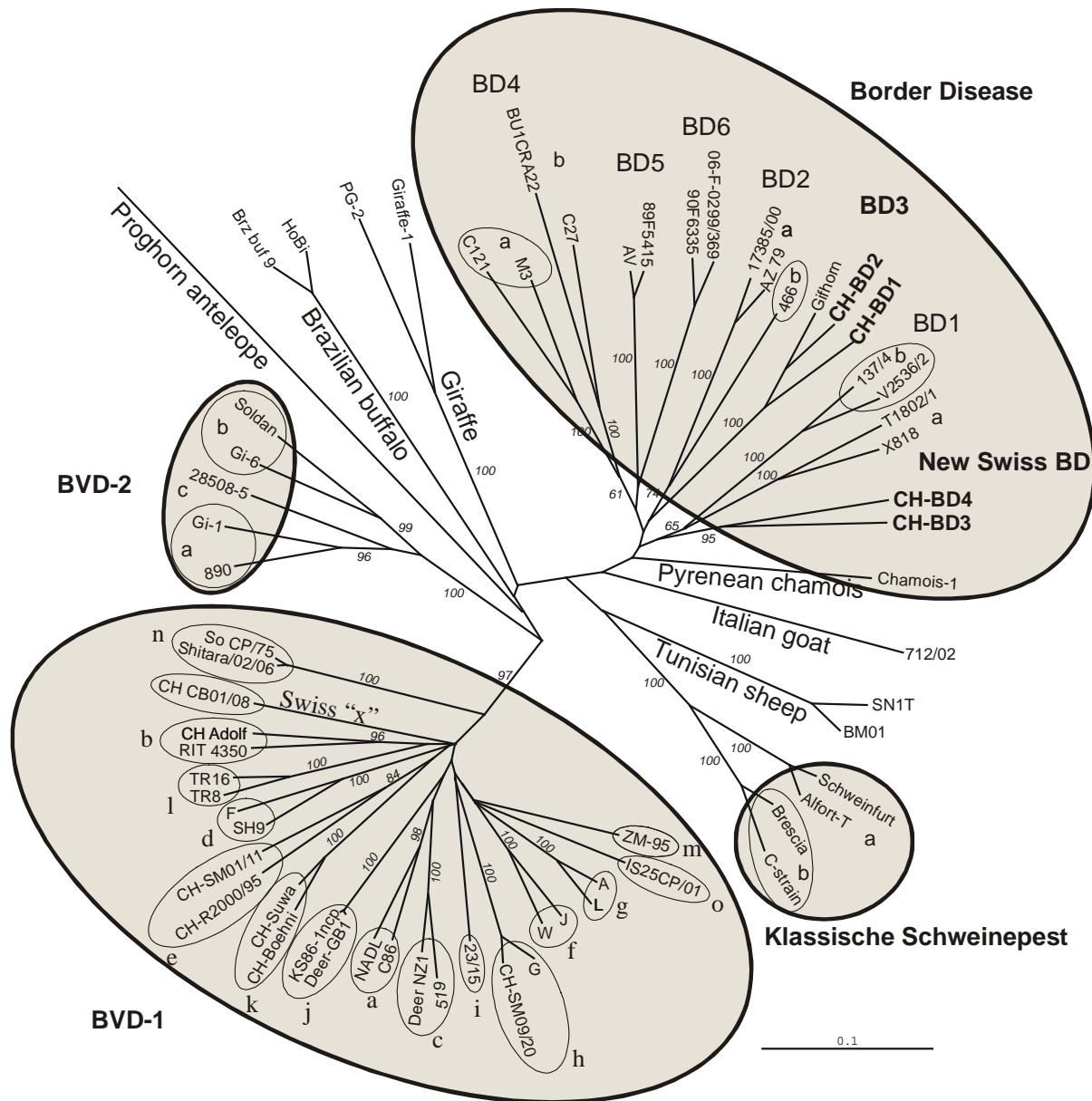
Familie	Genus	Spezies	Subtyp	Klassifikation
---------	-------	---------	--------	----------------



**Abb. 1:** Übersichtsdarstellung zur Taxonomie der Pestiviren

Aufgrund molekulargenetischer Untersuchungen zur Phylogenie unterteilten VILČEK et al. (1997) das Border-Disease-Virus in die Subtypen A und B (anstatt 1 und 2).

In der aktuellen Literatur wird vielfach auf die genetische Heterogenität oviner Pestivirusisolate verwiesen (STALDER et al., 2005; DUBOIS et al., 2008). Die ursprüngliche taxonomische Klassifizierung des Border-Disease-Virus wurde aufgrund umfangreicher molekulargenetischer Untersuchungen aktualisiert (Abb. 2).

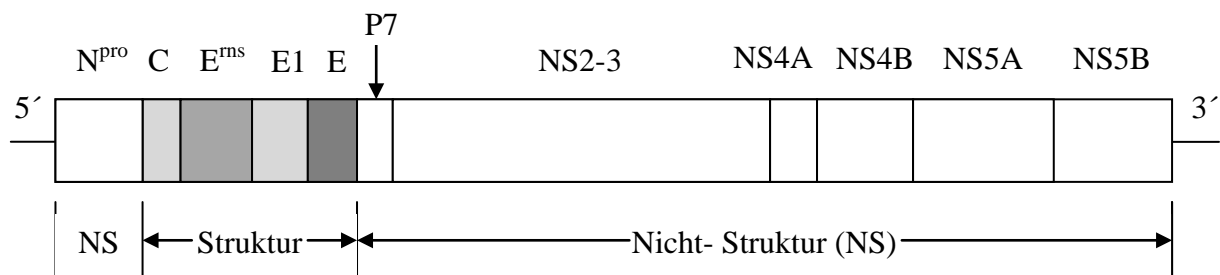


**Abb. 2:** Phylogenetischer Baum der Pestiviren, basierend auf der für das Virusprotein  $N^{\text{pro}}$ -kodierenden Sequenz (STALDER, 2008). Schweizerische BD-Stämme sind durch „CH-“ gekennzeichnet.

### 4.2.3. Struktur

Pestiviren sind behüllt und weisen eine sphärische Grundstruktur auf. Sie besitzen einen Durchmesser von etwa 40 bis 60 Nanometer und gehören zur Gruppe der (+)-Strang-RNA-Viren. Die RNA besitzt eine Länge von 12.3 kb und kodiert ein Polyprotein, das aus etwa 4000 Aminosäuren besteht (THABTI et al., 2002). Am 5'-Ende des Genoms befindet sich eine nicht kodierende Sequenz von etwa 385 Nukleotiden. Ihnen wird eine Aufgabe bei der Regulation von Translation und Replikation zugeschrieben. Dem 5'-Ende folgen eine Autoprotease ( $N^{pro}$ ), das Gen für das Kapsidprotein (C) und die Gene zur Kodierung dreier Glykoproteine ( $E^{ns}$ , E1 und E2). Die beiden, dem 3'-Ende zugewandten Drittel des Genoms kodieren Nicht-Struktur-Proteine.

Das Glykoprotein E2 ist Angriffspunkt für neutralisierende Antikörper. Weiterhin ist es beteiligt an der Bindung des Virus an die Wirtszelle. Es ist das Pestivirusprotein, welches die grösste Variabilität unter den verschiedenen Isolaten aufweist (PATON, 1995; PATON et al., 1997).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des offenen Leserahmens eines ncp-BD-Virus (modifiziert nach NETTLETON und WILLOUGHBY, 2007)

### 4.2.4. Tenazität und Überlebensfähigkeit

Pestiviren weisen eine geringe Tenazität auf und werden bei Temperaturen von 37 °C innert vier Tagen sowie durch alle gängigen Desinfektionsmittel inaktiviert (WEISS et al., 1994).

#### **4.2.5. Speziesspezifität und Interspeziesübertragung**

Das Auftreten des Krankheitsbildes der Border-Disease ist bei kleinen Wiederkäuern vielfach beschrieben worden und kann unter natürlichen und experimentellen Bedingungen nachvollzogen werden (HUGHES et al., 1959; BARLOW et al., 1980; BONNIWELL et al., 1987; LØKEN, 1987; SAWYER, 1992; CARLSSON und BELÁK, 1994; CAMPBELL et al., 1995; BRAUN et al., 2002; BRAUN et al., 2004). Neben dem Border-Disease-Virus wird bei kleinen Wiederkäuern häufig ein Biotyp des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe nachgewiesen (VILČEK et al., 1997; WILLOUGHBY et al., 2006; KIM et al., 2006; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008a).

Ruminante Pestiviren können die speziesspezifischen Barrieren durchbrechen und es kann zu gegenseitigen Infektionen zwischen Rind und Schaf kommen (CARLSSON, 1991; CARLSSON und BELÁK, 1994; CAMPBELL et al., 1995; PATON et al., 1997). Neben Rindern und Schafen sind Kreuzinfektionen auch bei Ziegen, Schweinen und nicht domestizierten Arten möglich (LØKEN, 1995; NETTLETON und ENTRICAN, 1995). Unter natürlichen Bedingungen scheint die Interspeziesübertragung in eine Richtung, nämlich vom Rind auf das Schaf, besonders ausgeprägt zu sein (LØKEN, 1995). Eine Untersuchung hat ergeben, dass das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe, sowohl unter natürlichen als auch unter experimentell-reproduzierbaren Bedingungen, von Rindern auf Schafe übertragen werden kann (CARLSSON, 1991). Der Autor sieht die primäre Ursache von Border-Disease-artigen Ausbrüchen bei Schafen im Kontakt empfänglicher Schafe zu persistent mit dem Bovinen Virus-Diarrhoe-Virus infizierten Rindern. Auch CAMPBELL et al. (1995) beschrieben einen Fall, bei dem es bei neugeborenen Schaflämmern zu den typischen klinischen Anzeichen der Border-Disease kam. Die Muttertiere hatten während der ersten Hälfte der Gravidität nachweislich Kontakt zu einem persistent mit BVDV infizierten Rind. Die Übertragungsmöglichkeit des Bovinen-Virus-Diarrhoe-Virus von persistent infizierten Färsen auf seronegative Ziegen wurde auch durch BROADDUS et al. (2007) nachgewiesen. KRA-



METTER-FRÖTSCHER et al. (2008a) berichteten von einer persistent mit BVDV infizierten Ziege, die gemeinsam mit Rindern unterschiedlicher Herkunftsbetriebe gealpt wurde.

Auch bezüglich der Übertragungsmöglichkeit vom kleinen Wiederkäuer auf das Rind liegen Untersuchungen vor. Ein persistent mit dem Border-Disease-Virus infiziertes Mutterschaf konnte eine Serokonversion sowohl bei Schafen der gleichen Herde als auch bei Rindern induzieren, die in räumlich engem Kontakt gehalten worden waren (CARLSSON und BELÁK, 1994). Die Übertragung des Border-Disease-Virus bzw. des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe auf Schafe bzw. Rinder, ausgehend von Ziegen, konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Die Ziegen, die dabei als Infektionsquelle dienten, waren zuvor mit einer pestiviruskontaminierten Orf-Vakzine geimpft worden (LØKEN et al., 1991).

Aufgrund der Möglichkeit einer Interspeziesübertragung und der antigenetischen Ähnlichkeit des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe zu dem Border-Disease-Virus wird von der Möglichkeit eines gemeinsamen Ursprungs der beiden Viren ausgegangen. Es wird eine Änderung in der Epitopexpression der Viren während der Interspeziesübertragung vermutet (CARLSSON und BELÁK, 1994). PATON et al. (1997) untersuchten die Variabilität der Epitopexpression des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe in Abhängigkeit von der Wirtsspezies beim Rind und beim Schaf. Dabei wurde in erster Linie die Modulation des Glykoproteins E2 bei den verschiedenen Wirten festgestellt. Folglich banden und neutralisierten monoklonale Antikörper gegen das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe bovine Virusisolate, nicht aber Isolate vom Schaf. Die Autoren führten eine Mutation der Aminosäure an neunter Stelle im Gen, welches das Glykoprotein E2 kodiert, an. Die Möglichkeit einer Interspeziesübertragung sowohl des Border-Disease-Virus als auch des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe kann ernsthafte, epidemiologische Konsequenzen mit sich bringen. Insbesondere bei gemeinsamer Haltung grosser und kleiner Wiederkäuer ist dies von Bedeutung, was im Rahmen von Kontrollprogrammen zu berücksichtigen ist (CARLSSON und BELÁK, 1994; CAMPBELL et al., 1995).

#### **4.2.6. Nachweis des Border-Disease-Virus beim Rind**

Bisher konnten zwei Autorengruppen das Border-Disease-Virus in bovinen Isolaten nachweisen (BECHER et al., 1997; CRANWELL et al., 2007).

Eine phylogenetische Analyse auf molekulargenetischer Ebene ermöglichte den Nachweis des Border-Disease-Virus bei einem Rind in Australien (BECHER et al., 1997). CRANWELL et al. (2007) untersuchten 1400 Blutproben von Rindern aus England und Wales, bei denen mittels Antigen-ELISA die Diagnose der Bovinen Virusdiarrhoe gestellt worden war. Sie verwendeten eine TaqMan-reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit dem Ziel, die Virusisolate zu differenzieren, also zwischen BVDV-1, BVDV-2 und dem Border-Disease-Virus unterscheiden zu können. In drei Fällen konnte das Border-Disease-Virus nachgewiesen werden. In den ersten beiden Fällen handelte es sich um ein dreizehn Monate sowie ein zweieinhalb Jahre altes Rind, die beide wegen Durchfall auffällig wurden. Im dritten Fall war ein kümmerndes, neugeborenes Kalb, welches unmittelbar nach der Geburt einging, betroffen. Die Symptome waren in allen Fällen identisch zu denen, die durch das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe ausgelöst werden.

### **4.3. Isolierung, Nachweis und Typisierung oviner Pestiviren**

#### **4.3.1. Isolierung oviner Pestiviren**

Virale Antigene können in Labmagen, Pankreas, Nieren, Schilddrüse, Haut und Hodengewebe abortierter Feten sowie persistent infizierter Tiere nachgewiesen werden. Die Virusisolierung selbst gelingt unter anderem aus Serum, heparinisiertem Gesamtblut sowie Gewebe aus Gehirn, Rückenmark, Milz und Knochenmark erkrankter Lämmer (CEBRA und CEBRA, 2002).

#### **4.3.2. Nachweis und Typisierung oviner Pestiviren**

Ursprünglich wurden die Pestiviren der Wiederkäuer, das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) Typ 1 und 2 sowie das Border-Disease-Virus, in Abhängig-

keit von der Tierart klassifiziert, aus welcher sie isoliert werden konnten. Vom Schaf isolierte Pestiviren wurden demnach als Border-Disease-Virus angesprochen, solche aus Rinderisolaten als das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (CARLSSON, 1991; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2007a und b). Die zunehmende Nutzung molekularbiologischer Typisierungsmethoden hat gezeigt, dass Schafe sowohl durch das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe als auch das Border-Disease-Virus infiziert werden können (VILČEK et al., 1997).

Die konventionelle Diagnosestellung der Infektion mit ovinem Pestivirus basiert auf Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assays (ELISAs; WILLOUGHBY et al., 2006), mit denen Pestivirus-Antikörper oder -Antigene in einer Herde nachgewiesen werden sowie auf molekularbiologischen Nachweismethoden (RT-PCR) und der Virusisolierung. Ziel der Virusisolierung ist es, Pestiviren im Blut persistent infizierter Tiere diagnostizieren zu können. Im Gegensatz zum RT-PCR-Nachweis können sowohl beim ELISA als auch bei der Virusisolation kolostrale Antikörper die Anwesenheit persistent virusausscheidender Tiere maskieren.

Da es keine routinediagnostischen Nachweismethoden für den spezifischen Nachweis von BDV gibt, werden in der Regel Diagnostika für den BVDV-Nachweis verwendet. Um das Border-Disease-Virus und das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe sowie seine Typen 1 und 2 in ovinen Probensammlungen sicher nachweisen und zwischen ihnen differenzieren zu können, entwickelten WILLOUGHBY et al. (2006) ein real time RT-PCR-(Reverse Transkriptase und Polymerase Kettenreaktions)-System mit spezifischen Primern und Sonden für den gezielten Nachweis der verschiedenen Pestivirus-Spezies. Auch mittels Genomsequenzierung können die Viren sicher differenziert werden. Da auch der Antikörper-Nachweis mittels ELISA in der Regel nicht spezifisch für BDV-Antikörper ist, muss der aufwändigere Serumneutralisationstest zur Differenzierung der Antikörper herangezogen werden.

Um bei einem Virusnachweis im Blut akute von persistenten Infektionen differenzieren zu können, sollte der Verdacht einer persistenten Virämie durch Wiederho-

lung der Blutuntersuchung nach drei Wochen bestätigt bzw. verworfen werden (NETTLETON et al., 1998).

#### **4.4. Epidemiologie der Border-Disease**

##### **4.4.1. Vorkommen und Verbreitung der Border-Disease**

Die Border-Disease kommt weltweit vor. Sie wurde erstmals 1959 in der Grenzregion zwischen England und Wales beschrieben und betrifft in der Hauptsache Schafe und Ziegen. Die Virusisolierung gelang ebenso bei vielen Wildwiederkäuern. Serologische Studien konnten weltweit Infektionen bei mehr als 40 Arten aufzeigen (HUGHES et al., 1959; NETTLETON und ENTRICAN, 1995; NETTLETON et al., 1998; MOBINI et al., 2002; MARCO et al., 2007).

In einigen Regionen ist die Erkrankung endemisch. Die Übertragung ist sowohl vertikal vom Muttertier auf die Nachkommen als auch horizontal von Tier zu Tier möglich (BARLOW et al., 1980). Von grösster epidemiologischer Bedeutung für die Verbreitung des Virus sind persistent virämische, lebenslange Dauerausscheider. Sie sind Infektionsquelle sowohl auf horizontalem (Virusausscheidung insbesondere peripartal) als auch auf vertikalem Weg. Ein persistent infiziertes Tier wird immer auch persistent infizierte Nachkommen zur Welt bringen (SAWYER, 1992).

##### **4.4.2. Seroepidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung von Pestiviren**

Seroepidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass weltweit zwischen 19 und 89 Prozent der Rinder Träger von Pestivirusantikörpern sind (HOUE, 1995). Beim Schaf liegt die Seroprävalenz von Pestivirusantikörpern in Abhängigkeit von der untersuchten Region zwischen 5 und 50 Prozent (NETTLETON et al., 1998). Aufgrund von Untersuchungen in Wildwiederkäuerpopulationen ist die Seroprävalenz je nach Region ebenfalls unterschiedlich hoch (NIELSEN et al., 2000; LILLEHAUG et al., 2003; KRAMETTER et al., 2004; OLDE RIEKERINK et al., 2005).

Seroprävalenzstudien in Schafpopulationen haben gezeigt, dass der Anteil an anti-körperpositiven Tieren in den einzelnen Regionen Europas teilweise sehr hoch ist (SCHLEINER et al., 2006). Basierend auf Ergebnissen von Prävalenzstudien aus verschiedenen Ländern, berichteten NETTLETON und WILLOUGHBY (2007) über eine Seroprävalenz von 5 bis 50 %. GRAHAM et al. (2001) stellten in Nord-irland eine Verbreitung von Pestivirus-Antikörperträgern von 5.3 %, SANDS und HARKNESS (1978) in England und Wales von 10.8 % , FROST et al. (1991) in Deutschland von 30.2 % und SCHALLER et al. (2000) in der Schweiz von bis zu 65 % fest. In einer österreichischen Untersuchung zur Verbreitung von Pestiviren konnte bei Schafen eine Herdenseroprävalenz von 62.9 % und eine individuelle Seroprävalenz von 29.4 % nachgewiesen werden (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2007b). Dabei ergaben sich die höchsten Titer für das BVDV-1, gefolgt von BDV und BVDV-2. Die Seroprävalenz bei Schafen war in Betrieben, in denen zusätzlich Rinder gehalten wurden, signifikant höher. Ebenso konnten regionale Unterschiede aufgezeigt werden. Die höchsten Prävalenzen wurden in Regionen gefunden, in denen die gemeinsame Alping von Rindern, Schafen und Ziegen eine grosse Rolle spielt.

## **4.5. Klinik und Pathogenese der Border-Disease**

### **4.5.1. Horizontale Virusübertragung**

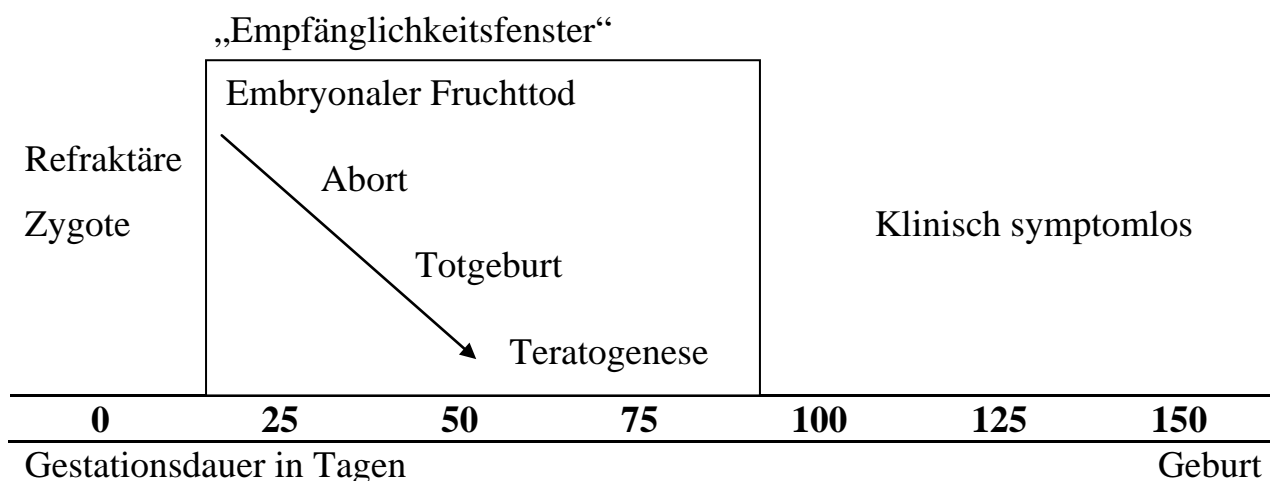
In mehreren Experimenten wurde gezeigt, dass Pestiviren sehr leicht horizontal und direkt von Tier zu Tier übertragen werden können (CARLSSON, 1991; McGOWAN et al., 1993). Dies geschieht natürlicherweise auf oronasalem Weg (NETTLETON et al., 1998). Einer indirekten horizontalen Virusübertragung durch unbelebte Vektoren kommt nur eine untergeordnete Bedeutung zu (SCHÖNMANN, 1997). Beim Rind wurde nachgewiesen, dass empfängliche Tiere durch infizierte Kanülen und Instrumente infiziert werden können (GUNN, 1993). Bei nicht trächtigen Muttertieren verläuft eine Infektion klinisch inappa-

rent; sie kann aber auch mit Unfruchtbarkeit einhergehen (BOSTEDT und DEDIÉ, 1996).

#### 4.5.2. Vertikale Virusübertragung, intrauterine Infektion

Nach SAWYER (1992) ergibt sich eine Empfänglichkeit des Fetus zwischen dem 16. und 90. Tag der Gravidität. Er bezeichnet diese Zeitspanne als „Empfänglichkeitsfenster“ (Abb. 4). Die vielfältigen Möglichkeiten der Expression klinischer Symptome leiten sich demnach in erster Linie aus dem Alter des Fetus zum Zeitpunkt seiner Infektion ab. Der Autor gibt vier mögliche Manifestationen an, welche eine Infektion im „Empfänglichkeitsfenster“ hervorrufen kann:

- a) Embryonaler Fruchttod mit konsekutiver Resorption
- b) Aborte und Totgeburten
- c) Geburt missgebildeter Lämmer
- d) Geburt kleiner, kümmernder Lämmer ohne offensichtliche klinische Symptome mit Anzeichen einer Immuninsuffizienz.



**Abb. 4:** Empfänglichkeit des Fetus während der Gravidität und Konsequenzen der Infektion in Abhängigkeit vom Gestationszeitpunkt (modifiziert nach SAWYER, 1992)

Vor der ersten Kolostrumaufnahme entnommenes Blut ist Virus-positiv und Antikörper-negativ (NETTLETON et al., 1998). Vor dem 16. Trächtigkeitstag gilt die Zygote als refraktär gegenüber einer Infektion. Nach dem 90. Trächtigkeitstag gilt der Fetus als ausreichend immunkompetent, um die Infektion ohne klinisch erkennbare Folgen zu durchlaufen (SAWYER, 1992). Das Blut enthält kein Virus, aber reichlich Antikörper. Im Gehirn finden sich nur noch mikroskopische, periarterielle Infiltrate und Herdchen (NETTLETON, 1990; BOSTEDT und DÉDIE, 1996).

Neben dem Alter des Fetus zum Zeitpunkt der Infektion gab SAWYER (1992) unterschiedliche Pathogenitäten des Virus sowie unterschiedliche Infektionsdosen und Infektionsrouten als mögliche Einflussfaktoren auf die Manifestation einer Erkrankung an.

#### **4.5.3. Transiente Infektion**

Gesunde, neugeborene und adulte Tiere, die mit dem Border-Disease-Virus in Kontakt kommen, zeigen nur milde klinische Symptome oder erkranken klinisch inapparent (NETTLETON et al., 1998). Dabei sind mildes Fieber und eine milde Leukopenie mit einer kurzen virämischen Phase verbunden, welche zwischen dem vierten und elften Tag nach der Infektion nachweisbar ist. Anschliessend erscheinen im Blut neutralisierende Antikörper. Nach GARCÍA-PÉREZ et al. (2009) findet die Seroconversion zwischen dem dreissigsten und vierzigsten Tag nach der Infektion statt. Die Tiere bleiben anschliessend lebenslänglich immun.

Gelegentlich sind Border-Disease-Virus-Isolate mit höherem Fieber und verlängerter Leukopenie, Anorexie, Konjunktivitis, Nasenausfluss, Dyspnoe und Diarrhoe verbunden (NETTLETON et al., 1998). CHAPPUIS et al. (1986) berichteten über ein solches Isolat in Verbindung mit einem Ausbruch der sogenannten Aveyron-Disease bei Milchschaften in Frankreich 1984. Ein zweites solches Isolat konnte infolge Kontamination in einer attenuierten Vakzine gegen die klassische Schweinepest nachgewiesen werden (TERPSTRA und WENSVOORT, 1988).

#### **4.5.4. Persistente Infektion**

Der Erfolg im Infektionsgeschehen von Pestiviren resultiert aus der Fähigkeit des nicht-zytopathogenen Biotyps, die Plazenta zu passieren und im sich entwickelnden Fetus eine persistente Infektion hervorzurufen (NETTLETON und ENTRICAN, 1995). Persistent infizierte Tiere sind virämisch, antikörpernegativ und scheiden permanent Virus aus. Diese Tiere gelten als hauptsächliche Infektionsquelle und besitzen epidemiologisch die grösste Bedeutung in der Virusverbreitung (NETTLETON et al., 1998). Bei solchen Tieren ist die Virämie jederzeit nachweisbar, mit Ausnahme der ersten beiden Lebensmonate, in welchen kolostrale Antikörper das Ergebnis maskieren können. Ebenso bilden einige der persistent infizierten Tiere im Alter von über drei Jahren niedrige Antikörperspiegel (NETTLETON et al., 1992). Persistent infizierte Schafe können bis zu 66 Monate alt werden (NETTLETON et al., 1992) und klinisch über lange Zeit unauffällig bleiben (TERPSTRA, 1981).

#### **4.5.5. Late-onset Disease bei persistent infizierten Tieren**

Einige persistent infizierte Schafe, die getrennt von anderen Tieren gehalten wurden, zeigten Auszehrung sowie hochgradigen Nasen- und Augenausfluss, manchmal kombiniert mit respiratorischen Symptomen (NETTLETON et al., 1998). Aus Gewebe des Darmes solcher Tiere konnte der zytopathogene Biotyp des Border-Disease-Virus isoliert werden. Aufgrund der Isolation von der Aussenwelt schien der entsprechende Biotyp aus dem eigenen Viruspool zu stammen. Andere persistent virämische Tiere der gleichen Gruppe entwickelten die Krankheit nicht. NETTLETON et al. (1998) bezeichneten dieses Syndrom als Late-onset Disease. Es weist viele Übereinstimmungen mit der Mucosal-Disease des Rindes auf (GARDINER et al., 1983; NETTLETON et al., 1992; MONIES und SIMPSON, 1997; NETTLETON et al., 1998).



#### **4.6. Pathologie der Border-Disease**

Bei persistent virämischen Tieren kann das Virus in nahezu allen Organen nachgewiesen werden. Typischerweise gibt es keine entzündlichen Reaktionen. Die charakteristischsten Veränderungen treten im zentralen Nervensystem und der Haut auf: unabhängig vom Infektionszeitpunkt während der Gestation kommt es zu einem Mangel an Myelin in der weissen Substanz.

Im Rahmen der Late-onset-Disease entsteht eine Verdickung der Wandschichten des terminalen Ileums, des Zäkums und des Kolons, die aus einer fokalen, hyperplastischen Enteropathie in entsprechenden Bereichen resultiert (NETTLETON et al., 1998). KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. (2008a) beschrieben Symptome einer fibrinopurulenten Pneumonie, Nephro-, Hepato- und Splenomegalie, katarrhalischen Abomasoenteritis sowie einer Vergrößerung von Kniefalten- und Mesenteriallymphknoten bei einer persistent mit BVDV infizierten Ziege. Aus Gewebeproben von Lunge, Leber, Milz, Niere, Gehirn und Darm konnten die Autoren einen nicht-zytopathogenen Pestivirus-Biotyp nachweisen. SAWYER (1992) beschrieb bei immuntoleranten, persistent infizierten Tieren charakteristische Veränderungen des Nervensystems, des endokrinen Systems, des Immunsystems, der Haut und des Skeletts.

#### **Nervensystem**

In den meisten Fällen kommt es zu einer nicht entzündlichen Hypomyelinisierung, welche von einem Absinken reifer Oligodendrozyten mit Proliferation dysmorpher Gliazellen begleitet ist (POTTS et al., 1985; ANDERSON et al., 1987a und b). Pathologisch-anatomisch fällt eine Mikroenzephalie auf (POTTS et al., 1985).

#### **Endokrines System**

Persistent infizierte Lämmer zeigen signifikant niedrigere Trijodthyronin-(T3)- und Thyroxin-(T4)-Spiegel im Serum als gleichaltrige, gesunde Kontrolltiere (ANDERSON et al., 1987a). Folglich zeigen solche Tiere signifikant niedrigere

Plasmaspiegel einer Schilddrüsenhormon-abhängigen Phosphodiesterase (2',3'-cyclische Nukleotid-3-Phosphodiesterase), die für die ordnungsgemäße Myelinisierung nervaler Strukturen während der Embryonalentwicklung verantwortlich ist. Die Infektion hypophysärer Zellen mit dem Border-Disease-Virus scheint keinen Einfluss auf die Produktion von STH (Somatotropes Hormon) oder TRH (Thyreotropin-Releasing-Hormon) zu besitzen (ANDERSON et al., 1987a), weshalb SAWYER (1992) das retardierte Wachstum und die abnorme Skelettentwicklung persistent virämischer Tiere auf das Defizit an Schilddrüsenhormonen zurückführte.

### **Immunsystem**

Gemeinsames Merkmal persistent infizierter Tiere ist die spezifische Immuntoleranz mit viraler Persistenz, lebenslänglicher Ausscheidung und Seronegativität (SAWYER, 1992). Die Funktion der Lymphozyten ist bei Neugeborenen herabgesetzt, kann sich jedoch mit der Zeit normalisieren (SAWYER et al., 1986). Sofern das Tier das Erwachsenenalter erreicht, bleibt dennoch eine gesteigerte Empfänglichkeit gegenüber interkurrenten Infektionen bestehen (SAWYER, 1992).

### **Haut und Skelett**

Das haarige Erscheinungsbild des Vlieses ist das Ergebnis einer Grössenzunahme primärer Haarfollikel und einer reduzierten Anzahl von Sekundärfollikeln (CARTER et al., 1972; ANDERSON et al., 2002). Die Indikatoren einer gestörten skelettalen Entwicklung sind ein retardiertes, intrauterines Wachstum, ein geringes Geburtsgewicht sowie Missbildungen im Kopfbereich (SAWYER, 1992; CAFFREY et al., 1997).

## **4.7. Infektionsversuche mit dem Border-Disease-Virus**

Über eine experimentelle, postnatale Infektion von seronegativen Tieren mit dem Border-Disease-Virus existieren bereits einige Untersuchungen (WINKLER et al.,

1975; RICHARDSON et al., 1976; BARLOW et al., 1980; BONNIWELL et al., 1987; LØKEN et al., 1990; LØKEN und BJERKÅS, 1991; THABTI et al., 2002; BRAUN et al., 2004; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008b; GARCÍA-PÉREZ et al., 2009; REICHLE, 2009).

RICHARDSON et al. (1976) infizierten trächtige Mutterschafe intramuskulär mit unterschiedlich hohen Infektionsdosen. Sie beschrieben dosisabhängig unterschiedliche serologische Reaktionen sowie variierende Auswirkungen auf die Neonaten.

BARLOW et al. (1980) brachten seronegative Schaflämmer in eine Herde von 6 infizierten Lämmern, deren Mütter experimentell mit Border-Disease-Virus infiziert worden waren.

BONNIWELL et al. (1987) beschrieben den Versuch einer „natürlichen Vakzinierung“ seronegativer Lämmer durch persistent infizierte Schafe.

LØKEN et al. (1990) infizierten gesunde, neugeborene Ziegenlämmer mit einem nicht-zytopathogenen Biotyp des BD-Virus ( $10^{5.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml) oder einem zytopathogenen Biotyp des BVD-Virus ( $10^{6.1}$  TCID<sub>50</sub>/ml). Die Infektion erfolgte teilweise durch intramuskuläre (1 ml) und teilweise durch intracerebrale (0.3 ml) Injektion. Ein Teil der Tiere zeigte klinische Symptome wie Anorexie und Durchfall. In Blutproben, die fünf und zehn Tage nach der experimentellen Infektion entnommen wurden, konnte kein Virus nachgewiesen werden. Alle infizierten Tiere serokonvertierten.

Ein weiterer Infektionsversuch beschäftigte sich mit der Infektion von trächtigen Ziegen mit dem BD-Virus zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Gravidität (LØKEN und BJERKÅS, 1991). Die Infektion erfolgte durch die Verabreichung von  $5 \times 10^{5.3}$  TCID<sub>50</sub> auf intramuskulärem Weg an den Trächtigkeitstagen 40, 60 und 100. Alle Ziegen serokonvertierten innerhalb von 5 Wochen nach der Infektion. Die Manifestation klinischer Symptome bei den Nachkommen schien umso stärker, je früher die Muttertiere infiziert worden waren. Zusammenfassend wurde eine hohe Inzidenz von Reproduktionsstörungen festgestellt. Die Autoren führen

an, dass der pathologische Effekt von Pestivirusinfektionen auf die Gravidität bei Ziegen höher zu sein scheint als bei Schafen.

BRAUN et al. (2004) hielten acht gesunde, seronegative Schaflämmer gemeinsam mit einem persistent infizierten Schaflamm über einen Zeitraum von 154 Tagen. Dabei serokonvertierten sechs von acht Lämmern, eines zeigte eine fraglich positive serologische Reaktion und ein weiteres reagierte stets seronegativ. Bei zwei der acht Lämmer konnte eine transiente Virämie nachgewiesen werden.

KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. (2008b) hielten seronegative Kälber gemeinsam mit persistent mit dem Border-Disease-Virus infizierten Schafen. Alle Kälber serokonvertierten; pestivirale RNA wurde zu keinem Zeitpunkt aus Blutproben isoliert. Ein Serumneutralisationstest zeigte, dass die induzierten Antikörper gegen das Border-Disease-Virus gerichtet waren.

Mit dem Ziel, die Pathogenität lokaler, oviner Pestivirusisolate zu untersuchen, infizierten GARCÍA-PÉREZ et al. (2009) virologisch- und serologisch-negative Mutterschafe zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Gravidität. Die Infektion erfolgte durch intramuskuläre Injektion. Die Infektionsdosis lag bei  $10^6$  TCID<sub>50</sub>. Das erste Tier serokonvertierte am Tag 11 nach der Infektion. Bis zum Tag 35 serokonvertierten alle Tiere. Während des gesamten Versuchs konnten mittels ELISA keine Pestivirusantigene nachgewiesen werden. Mithilfe der rt-PCR wurde, von zwei Ausnahmen abgesehen, bei allen Tieren Border-Disease-Virus im Blut nachgewiesen. Der Nachweis gelang zwischen den Tagen 2 und 15 nach der Infektion. Die Virämie dauerte zwischen einem und zehn Tagen.

REICHLE (2009) beschrieb einen ähnlichen Infektionsversuch, bei dem seronegative Kälber mit persistent mit dem Border-Disease-Virus infizierten Schafen gehalten wurden und im Verlauf serokonvertierten.

## **5. Tiere, Material und Methodik**

### **5.1. Tiergruppen**

Für die Untersuchungen wurden drei Tiergruppen verwendet. Die Gruppe A bestand aus 7 Kälbern, die Gruppe B aus 7 Ziegen und die Gruppe C aus acht Schafen.

#### **5.1.1. Tiergruppe A: Kälber**

Die Tiergruppe A bestand aus 7 Kälbern im Alter von 87 bis 176 Tagen ( $145.9 \pm 32.65$  Tagen) aus zwei Betrieben. Drei Kälber gehörten der Fleckviehrasse und eines der Holstein-Friesian-Rasse an. Weitere drei Kälber waren Gebrauchskreuzungen zwischen Braunvieh und Charolais bzw. zwischen Holstein-Friesian und Charolais. Vier Kälber waren männlich und drei weiblich.

#### **5.1.2. Tiergruppe B: Ziegen**

Die Tiergruppe B bestand aus 7 weiblichen Burenziegen aus einem CAE-negativen Betrieb. Die Tiere waren 213 bis 318 Tage alt ( $255.6 \pm 45.35$  Tage).

#### **5.1.3. Tiergruppe C: Schafe**

Die Tiergruppe C bestand aus acht weiblichen Weissen Alpenschafen. Die Tiere waren zwischen 172 und 182 Tagen alt ( $177.4 \pm 3.62$  Tage).

### **5.2. Pestivirusstatus der drei Tiergruppen**

Die Tiere der drei Tiergruppen waren vor ihrem Ankauf mittels Blutuntersuchung negativ auf Pestivirusantigen (siehe 5.7.1.) getestet worden. Ebenso negativ waren die Testergebnisse auf Pestivirusantikörper im Blut (siehe 5.8.1.) und auf Pestivirusantigen in Hautbiopsien (THÜR et al., 1997; BRAUN et al., 2002; ARQUINT, 2003).

### **5.3. Herkunft und Kultivierung des zur Infektion verwendeten BD-Virus**

#### **5.3.1. Herkunft des zur Infektion verwendeten BD-Virus**

Das Virus stammte von einem persistent mit BD-Virus infizierten weiblichen Schaf des Departements für Nutztiere. Es handelte sich um ein im Jahr 2006 geborenes Weisses Alpenschaf. Das Tier wurde im Alter von 2 Tagen ans Tierspital Zürich gebracht, da es typische Symptome von Border-Disease wie Ataxie, Tremor und haariges Vlies aufwies. Die Untersuchung auf BD-Virus in einer Hautbiopsie war positiv gewesen. Über einen Zeitraum von einem Jahr war infektiöses Virus auch in Leukozyten und intermittierend in Nasentupfern und Serum nachgewiesen worden. Das aus Leukozyten isolierte Virus wurde als CH-BD4 bezeichnet (Abb. 2).

#### **5.3.2. Kultivierung des zur Infektion verwendeten BD-Virus**

Das Virus wurde im Institut für Veterinär-Virologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern aus Leukozyten des persistent infizierten Schafes isoliert und kultiviert. Für die Gewinnung von Leukozytenpellets wurden in einem Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG, CH-9475 Sevelen) 5ml Hämolysepuffer (HLP) vorgelegt (144mM Ammoniumchlorid, 17mM Tris, Hydroxymethylaminomethan, pro analysi; Merck (Schweiz) AG, CH-6300 Zug) und mit 3 bis 5 ml antikoaguliertem Blut gemischt. Nach der Hämolyse wurden die Röhrchen 10 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde erneut mit 5 ml HLP resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium suspendiert (Earle's minimal essential medium (MEM) von Seromed (Biochrom AG, D-80637 München) mit 2 % fetalem Kälberserum (frei von Pestivirus und Antikörpern gegen Pestiviren; Oxoid GmbH, D-46467 Wesel). Für die Virusisolation wurden 500 µl der Leukozyten-Suspension mit demselben Volumen Zellkulturmedium gemischt und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche pipettiert, welche einen Zellrasen, bestehend aus ungefähr 8 x 10<sup>5</sup> „lamb synovial membrane“-(LSM)-Zellen, enthielt. Nach einer In-

kubationszeit von 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden 4 ml frisches Zellkulturmedium zugegeben und die Zellkulturen während 5 Tagen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator belassen. Um die Zellen aufzuspalten und das Virus zu ernten, wurde die Zellkulturflasche bei -20 °C tiefgefroren und anschliessend wieder aufgetaut. Das Zellkulturmedium wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und 10 Minuten bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Um den Virustiter im zellfreien Überstand zu eruieren, wurde dieser in Zellkulturmedium in 1:10 Schritten verdünnt und jede Verdünnung wurde in 6 Vertiefungen einer mit LSM-Zellen beschichteten Mikrotiterplatte verteilt und während 5 Tagen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die viralen Proteine wurden anschliessend mittels Immunperoxidase-(IPO)-Färbung (ADLER et al., 1994) sichtbar gemacht und der Virustiter wurde in Tissue-Culture-Infectious-Dose<sub>50</sub> (TCID<sub>50</sub>) nach der Methode von REED und MÜNCH (1938) berechnet. Um eine ausreichende Menge an Virus für die experimentelle Infektion zu gewinnen, wurde das Virus noch weitere zwei Male auf LSM-Zellen passagiert, wobei für die Infektion jeweils eine „multiplicity of infection“ (MOI) von 0.01 verwendet wurde. Für die letzte Passage wurden fünf 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verwendet, was einem Volumen von 250 ml Zellkulturmedium entspricht. Der Virustiter des Infektionsvirus wurde anschliessend wie oben beschrieben bestimmt.

## **5.4. Untersuchungsort und -zeitraum**

### **5.4.1. Haltung der Tiere**

Die Untersuchungen fanden in einem Laufstall auf dem Areal der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich statt. Die einzelnen Tiergruppen wurden während der gesamten Untersuchungsphase voneinander getrennt gehalten. Sie hatten täglich je zwei Stunden Auslauf auf einem betonierten, eingezäunten Platz. Die Futterration bestand aus Heu ad libitum, welche bei den Gruppen A und B durch Kraftfutter ergänzt wurde. Allen Tiergruppen standen zudem mineralisierte Salzlecksteine zur Verfügung. Ebenso hatten sie stets freien Zugang zur Wassertränke.

Der Stall wurde mit einer Liegematte aus Stroh eingestreut. Die Stalltemperatur lag zwischen 10 und 21.5 °C ( $16.1 \pm 2.96$  °C), die Luftfeuchtigkeit zwischen 38 und 73 % ( $56.2 \pm 6.80$  %). Die Aussentemperatur schwankte während der Untersuchungsphase zwischen 0 und 24 °C ( $12.2 \pm 6.86$  °C), die Luftfeuchtigkeit zwischen 18 und 78 % ( $49.3 \pm 12.95$  %).

#### **5.4.2. Untersuchungszeitraum**

Die Untersuchungen wurden zwischen dem 6. März und dem 5. Juni 2008 durchgeführt.

#### **5.5. Untersuchungsphasen**

Die Untersuchungsphasen gliederten sich in eine Akklimatisationsphase und eine Infektionsphase.

##### **Akklimatisationsphase**

Die Akklimatisationsphase dauerte 17 Tage und diente der Angewöhnung und Überwachung der Tiere. Sie stellte zugleich eine Quarantänephase dar. Kein Tier durfte während dieser Phase den serologischen Status verändern. Durch strikte Kleidervorschriften wurde das Risiko einer Virusübertragung klein gehalten. Dazu gehörten die Stiefeldesinfektion mit Incidin<sup>®</sup> PLUS (Ecolab GmbH, CH-4132 Muttenz) und die Händedesinfektion mit Baktolin<sup>®</sup> und Sterilium<sup>®</sup> (Bode Chemie, D-22525 Hamburg) sowie der tägliche Wechsel von separater Schutzkleidung.

##### **Infektionsphase**

Die Infektionsphase begann am Tag 0 mit der Infektion und dauerte 70 Tage. Am Tag 0 wurden die Tiere intraoral mit dem Border-Disease-Virus des persistent infizierten Schafes infiziert.



## **5.6. Durchführung der Untersuchungen**

### **5.6.1. Durchführung der Infektion**

Am Tag 0 wurden die Tiere mittels einer Sprayflasche (Handzerstäuber, Foxy plus, Birchmeier Sprühtechnik AG, CH-5608 Stetten) intraoral mit dem Border-Disease-Virus infiziert. Zuvor war die Sprühflasche am Institut für Veterinär-Virologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern auf ihre Eignung hinsichtlich Material und Sprühvolumen überprüft worden. Bis kurz vor der Verwendung wurde das Infektionsvirus auf Trockeneis gefroren gehalten. Für die Infektion wurde das Tier fixiert und das virushaltige Material wurde mit vier Pumpstössen à 1.2 ml verabreicht. Dies entsprach einer Virusmenge von ca.  $0.5-1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> pro Tier.

Vor der Infektion des ersten Tieres und nach der Infektion des letzten Tieres wurde je ein Pumpstoss in ein Kunststoffröhrchen gesprüht und auf Trockeneis eingefroren. Später wurde daraus die tatsächlich verabreichte Menge an infektiösem Material bestimmt. Die Virustitration dieser Proben ergab, dass jedes Tier zwischen  $0.2$  und  $0.7 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> erhalten hatte.

### **5.6.2. Klinische Untersuchungen**

Die Tiere wurden bis zum 35. Tag nach der Infektion täglich klinisch untersucht (Tab. 1). Beurteilt bzw. gemessen wurden das Allgemeinbefinden, die rektale Temperatur, das Herz- und Kreislaufsystem sowie der Atem- und Verdauungsapparat. Im Weiteren wurden die Schleimhäute sowie die äussere Haut und deren Anhangsorgane beurteilt. Ab dem 35. Tag beschränkte sich die Untersuchung auf die tägliche Beobachtung.

**Tab. 1:** Zeitplan für die klinischen Untersuchungen und die Probenentnahmen

Tag	-9	-6	-3	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	25	28	32	35	42	49	56	63	70
K																																		
NT																																		
BP																																		
V																																		
S																																		
H																																		

Feld leer Keine Untersuchungen bzw. Probenentnahmen, Graue Felder Untersuchungen bzw. Probenentnahmen

K Klinische Untersuchung, NT Nasentupferentnahme, BP Blutprobenentnahme, V Virologische Untersuchung, S Serologische Untersuchung, H Hämatologische Untersuchung

### 5.6.3. Entnahme von Nasentupfern

Vom Tag der Infektion bis zum 21. Tag nach der Infektion wurden täglich Tupferproben (UTM-kit 346c<sup>®</sup>, Copan Italia S.p.A., I-25125 Brescia) aus den Nasenöffnungen aller Tiere entnommen (Tab. 1). Die Entnahme erfolgte nach sterilen Kautelen. Der Nasentupfer wurde in eine Nasenöffnung eingeführt und durch vorsichtiges Drehen wurde etwas Sekret gewonnen. Unmittelbar nach der Probenentnahme wurden die Tupfer in die dazugehörigen Kunststoffröhrchen mit Medium verbracht, verschlossen und zur virologischen Untersuchung versandt.

### 5.6.4. Entnahme von Blutproben

Während der Akklimatisationsphase wurden Blutproben zu den Zeitpunkten -3, -6 und -9 entnommen, in der Infektionsphase bis zum 21. Tag nach der Infektion täglich, daraufhin bis zum 35. Tag zweimal wöchentlich und anschliessend bis zum Ende der Untersuchungen einmal wöchentlich (Tab. 1).

Die Blutprobenentnahmen erfolgten abwechselnd aus beiden Jugularvenen. Bei jeder Blutentnahme wurden jeweils mittels Vakuümröhrchen (Vacuette<sup>®</sup>, greiner bio-one, A-4550 Kremsmünster) 8 ml EDTA-Blut und 6 ml Serum entnommen. Das Blut wurde für den Antigen- bzw. Antikörpernachweis und für die hämatologische Untersuchung verwendet. Die Haut über den Jugularvenen wurde enthaart, mit alkoholgetränkten Tupfern entfettet und mit Jodlösung (Betadine<sup>®</sup> Lösung, Mundipharma Medical Company, Hamilton/Bermuda) desinfiziert. Im Falle des Auftretens von Schwellungen wurde lokal mit heparinhaltigem Gel (HepaGel<sup>®</sup>, Spirig Pharma AG, CH-4622 Egerkingen) behandelt.

## **5.7. Virologische Untersuchungen**

### **5.7.1. Nachweis viraler RNA im Blut**

Die virologische Untersuchung wurde vom Tag der Infektion bis zum 21. Tag nach der Infektion täglich, anschliessend an den Tagen 25, 28, 32, 35, 63 und 70 durchgeführt (Tab. 1). Sie erfolgte im Institut für Veterinär-Virologie der Vet-suisse-Fakultät der Universität Bern.

Der Nachweis viraler RNA im EDTA-Blut und im Nasentupfer-Medium erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Für die vorgängige RNA-Isolation aus antikoaguliertem Vollblut wurden das BioRobot-Universal-System und der QIAamp-Virus-BioRobot-MDx-Kit, beide von QIAGEN (QIAGEN AG, CH-8694 Hombrechtikon), verwendet. Anschliessend wurde die RNA entsprechend dem Protokoll des Cador BVDV-RT-PCR-Kits (QIAGEN AG, CH-8694 Hombrechtikon) mit dem Master-Mix, der alle Reagenzien und Enzyme für die Reversetranskription und die spezifische Amplifikation enthält, und der internen Kontrolle, welche eine Hemmung der RT-PCR durch möglicherweise in der Probe vorhandene Inhibitoren anzeigt, gemischt. Die im Master-Mix enthaltenen Primer und Sonden erkennen eine bei Pestiviren konservierte Genom-Sequenz (Panpesti) und können darum auch für die Detektion von Border-Disease-Virus verwendet werden. Als Kontrolle wurde virale RNA des BDV-Stammes „Moredun“ mitgeführt. Für die Reaktion wurde

der Thermocycler ABI 7300 verwendet (Applied Biosystems, CH-6943 Rotkreuz). Nach Auswertung der Rohdaten wurde die in der Probe vorhandene virale RNA-Menge in CT-Werten ausgedrückt, wobei ein CT-Wert  $< 45$  als positiv galt. Proben mit CT-Werten zwischen 30 und 45 wurden als schwach positiv bezeichnet. Proben, welche ein positives Resultat ergaben, wurden nach Abschluss aller initialen Untersuchungen nochmals getestet, um den Befund zu bestätigen. Die RNA-Isolation und die RT-PCR-Präparation wurden in speziell dafür vorgesehenen und räumlich getrennten Labors durchgeführt.

### **5.7.2. Nachweis viraler RNA in den Tupferproben**

Die Medium-Röhrchen wurden aufgemischt (Vortex Reagenzglas-Mixer) und der darin enthaltene Tupfer wurde entfernt. Das Transport-Medium konnte direkt für die weitere Untersuchung verwendet werden. Die Analyse erfolgte nach dem unter 5.7.1 beschriebenen Verfahren für den viralen RNA-Nachweis im Blut.

### **5.7.3. Virus-Sequenzierung**

Um eine Kontamination oder massive Veränderung des Infektionsvirus aufgrund der Zellkulturpassagen auszuschliessen, wurde dessen Genom-Sequenz mit derjenigen verglichen, welche direkt von dem persistent infizierten Schaf isoliert wurde. Ebenso wurde bei positiven Proben der experimentell infizierten Tiere (Virämie) versucht, die virale RNA zu sequenzieren. Dies geschah beim Schaf 1 am 8. und beim Schaf 2 am 7. Tag nach der Infektion.

Dafür wurde eine konventionelle RT-PCR mit dem OneStep-RT-PCR-Kit (QIAGEN AG, CH-8694 Hombrechtikon) durchgeführt. Für die Sequenzierung der 5' nicht-translatierten Region (ntr) wurden die von VILČEK et al. (1994) beschriebenen Pan-Pestivirus Primer 324/326 verwendet, welche ein DNA-Fragment von 288 Nukleotiden Länge amplifizieren (basierend auf dem Referenz-Stamm NADL; COLLETT et al., 1988). Die PCR-Produkte wurden mittels 1 % Agarose Gel-Elektrophorese aufgetrennt und DNA-Fragmente der korrekten Länge wurden

mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN AG, CH-8694 Hombrechtikon) aus dem Gel isoliert. Nach spektrophotometrischer Bestimmung der DNA-Menge (206 nm) wurden die benötigten Mengen an DNA-Produkt, Primer und Wasser (aqua ad injectabilia, Dr. G. Bichsel AG, CH-3800 Interlaken) entsprechend den Empfehlungen gemischt und für die Sequenzierungsreaktion an die Microsynth GmbH, CH-9436 Balgach, geschickt. Für die Analyse der Sequenzierungs-Daten wurden die SeqMan- (DNASTAR Inc., Madison, USA) und Clone Manager- (Scientific & Educational Software, Cary, USA) Softwares verwendet.

## **5.8. Serologische Untersuchungen**

### **5.8.1. Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)**

Die serologische Untersuchung mittels Antikörper-ELISA fand vom Tag der Infektion bis zum Ende der Untersuchungen einmal wöchentlich an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 und 70 statt (Tab. 1). Es wurde der am Institut für Veterinär-Virologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern entwickelte In-house-Antikörper-ELISA verwendet. Für diesen Test wurden Mikrotiterplatten (Maxisorp, A/S Nunc, Kamstrup, Dänemark) kolonnenweise, alternierend mit je 100 µl/Delle Virusantigen (mit dem cp BVD-1a Virus A1138/69 infizierte, Tween20 behandelte Zellkulturen) respektive negativem Kontrollantigen (nicht infizierte Zellkulturen) in einer definierten Verdünnung mit Beschichtungspuffer (0.1 M Natriumcarbonat-Bicarbonat, pH 9.6) beschichtet und während 16 Stunden bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die beschichteten Platten wurden anschliessend dreimal mit Waschpuffer (0.5M NaCl; 0.02M Tris; 0.005 % Tween20, pH 8.0) gewaschen. Die Vollblutproben (nicht antikoaguliert) wurden während 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert, wodurch sich das Serum vom Blutkoagulum abtrennte und abpipettiert werden konnte. Die Serumproben wurden 1:10 in 1 % Milchpuffer (Bio-Magermilchpulver gelöst in Waschpuffer) verdünnt und in die Platten verteilt (100 µl/Delle). Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Für den Nachweis der gebundenen Antikörper wurde an Peroxidase gekoppeltes Ziegen-anti-Rinder IgG (Microtec Produkte AG, CH-8423 Embrach) in jede Delle pipettiert und während 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde zur Sichtbarmachung der konjugierten Antikörper die Chromogenlösung ABTS (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) zugegeben und die Färbung mittels eines ELISA-Platten-Lesers gemessen (Extinktion bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$ ).

### **5.8.2. Serumneutralisation**

Um zu bestätigen, dass die detektierten Antikörper tatsächlich gegen BDV gerichtet waren, wurde die neutralisierende Eigenschaft der Serumproben der Zeitpunkte 0 und 70 gegen BDV (CH-BD4, Abb. 2) und BVDV (CH-04-01b, BACHOFEN et al., 2008) untersucht. Aufgrund der grossen Probenzahlen wurden in einem ersten Schritt „screening“-artig von allen Proben nur ein oder zwei Serum-Verdünnungsstufen untersucht und die Reaktion gegen BDV und BVDV verglichen. Die 22 Seren des Zeitpunkts 0, die keine spezifische Virus-Hemmung aufweisen sollten, wurden 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt, anschliessend wurde der einen Hälfte jeder Probe im Verhältnis 1:2 Border-Disease-Virus, der anderen Hälfte BVD-Virus zugegeben, was eine Serum-Endverdünnung von 1:20 ergab. Die Serum-Virus-Mischungen wurden während 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde für den BVDV-Nachweis jede Mischung auf 6 Dellen einer mit embryonalen Kälbernasen-Epithel-(EKaNaEp)-Zellen bestückten Mikrotiterplatte verteilt (100 µl/Delle). Für die BDV-Mischungen wurden Mikrotiterplatten mit LSM-Zellen verwendet. Für die Proben des End-Zeitpunktes wurde dasselbe Verfahren angewendet, jedoch wurden zwei Verdünnungsstufen gewählt. Antikörper-ELISA positive Seren wurden auf eine Endverdünnung von 1:200 und 1:2000, ELISA negative Seren auf 1:20 und 1:400 vorverdünnt.

Von vier Proben des Zeitpunktes 70 Tage wurde der genaue Antikörper-Titer gegen BDV bestimmt. Dafür wurden die Seren in Zellkulturmedium in 1:2 Schritten

zunehmend verdünnt und mit einer festgelegten Menge BDV 1:2 gemischt. Die Virus-Serum-Mischungen wurden 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschliessend wurde jede Verdünnung auf 6 Dellen (100 µl/Delle) einer 96-er Mikrotiterplatte verteilt. Der Boden der Dellen wurde vorgängig mit LSM-Zellen beschichtet. Die Platten wurden während 5 Tagen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschliessend wurden die mit Pestivirus infizierten Zellen mittels IPO-Färbung sichtbar gemacht. Die eingesetzte Menge BDV wurde mittels Virustitration überprüft. Der Titer sollte dabei möglichst nahe an 100 TCID<sub>50</sub>/Delle sein. Der neutralisierende Antikörper-Titer wurde als reziproker Wert derjenigen Serum-Verdünnung ausgedrückt, bei welcher die Antikörper in 50 % der Dellen eine Infektion verhindern konnten (REED und MÜNCH, 1938).

## **5.9. Hämatologische Untersuchungen**

Die hämatologische Untersuchung umfasste die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl, des Differentialblutbildes, des Hämatokrits und des Hämoglobins (Tab. 1 und Tab. 2; automatisch: CELL-DYN<sup>®</sup> 3500, Abbott Laboratories, Abbott AG, CH-6341 Baar). Darüber hinaus wurden die Erythrozytenindizes (MCHC, MCH und MCV) berechnet (Tab. 2).

Die hämatologischen Untersuchungen erfolgten im Veterinärmedizinischen Labor der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich. Sie wurden zu den in der Tab. 2 angegebenen Zeitpunkten durchgeführt.

**Tab. 2:** Zeitplan für die hämatologischen Untersuchungen

Parameter	Untersuchungstage			
	-17 bis -1	0 bis 21	22 bis 35	36 bis 70
Leukozytenzahl	-9, -6, -3	täglich	2x/Woche	wöchentlich*
Differentialblutbild	-9, -6, -3	täglich	2x/Woche	wöchentlich*
Hämatokrit	-9, -6, -3	täglich	2x/Woche	wöchentlich*
Hämoglobin	-9, -6, -3	täglich	2x/Woche	wöchentlich*
Erythrozyten	-9, -6, -3	täglich	2x/Woche	wöchentlich*
MCHC	-9, -6, -3	täglich	2x/Woche	wöchentlich*
MCH	-9, -6, -3	täglich	2x/Woche	wöchentlich*
MCV	-9, -6, -3	täglich	2x/Woche	wöchentlich*

\*: ausgenommen am Tag 63 p.i. (Tage 42, 49, 56 und 70 p.i.)

### 5.10. Vorgehen beim Auftreten von erosiven Veränderungen

Beim Auftreten von erosiven Veränderungen am Maul, in der Maulhöhle oder an anderen Schleimhäuten wurden gesonderte Tupferproben entnommen. Dazu wurden die Erosionen betupft und die Proben unmittelbar ins Transportmedium des Tupfersystems UTM-kit 346c<sup>®</sup> (Copan Italia S.p.A., I-25125 Brescia) eingebracht. Sofern schorfartige Oberflächenauflagerungen vorhanden waren, wurden diese entfernt und ebenfalls in Transportmedium verbracht. Allfällige Veränderungen wurden zudem photographisch dokumentiert.

### 5.11. Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe des Programms StatView 5.1 (SAS Institut, CH-8602 Wangen) statistisch erfasst und untersucht. Die kontinuierlichen Daten wurden deskriptiv analysiert und für jede Tiergruppe wurden die Mittelwerte und deren Standardabweichungen angegeben. Die weiterführenden statistischen Analysen wurden mit dem Programm Stata durchgeführt (Stata Corp., 2009; Stata Statistical Software: Release 10.1; College Station, TX, USA: StataCorp LP). Dabei wurde ein generalisiertes lineares Modell angewendet, um die Variablen Leukozyten- und Lymphozytenkonzentration auf signifikante Veränderungen im Verlauf der Untersuchungen zu prüfen. Das zugrundeliegende Stata Modell lautete „xtmixed



Variable Time Tierart || Time: R. Tierart, covariance (identity)“. Grundsätzlich wurde ein P-Wert von  $\leq 0.05$  als signifikant angesehen.

### **5.12. Zusammenarbeit mit anderen Institutionen**

Am Zustandekommen der vorliegenden Arbeit waren ausser der Klinik für Wiederkäuer der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich (Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun) die folgenden Institute und Abteilungen der Vetsuisse-Fakultäten Zürich und Bern beteiligt:

- Institut für Veterinär-Virologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern (Prof. Dr. E. Peterhans): Durchführung der virologischen und serologischen Untersuchungen durch Frau Dr. C. Bachofen
- Veterinärmedizinisches Labor der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich (Prof. Dr. H. Lutz): Durchführung der hämatologischen Untersuchungen
- Abteilung für Bestandesmedizin der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich (Prof. Dr. M. Hässig): Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

### **5.13. Tierversuchsbewilligung**

Für die Untersuchungen lagen eine Tierversuchsbewilligung und zwei dazugehörige Ergänzungen des Kantonalen Veterinäramts Zürich vor. Sie waren unter der Nummer 19/2008 registriert und vom 5. März 2008 bis zum 5. März 2009 gültig.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Kälber (Tiergruppe A)

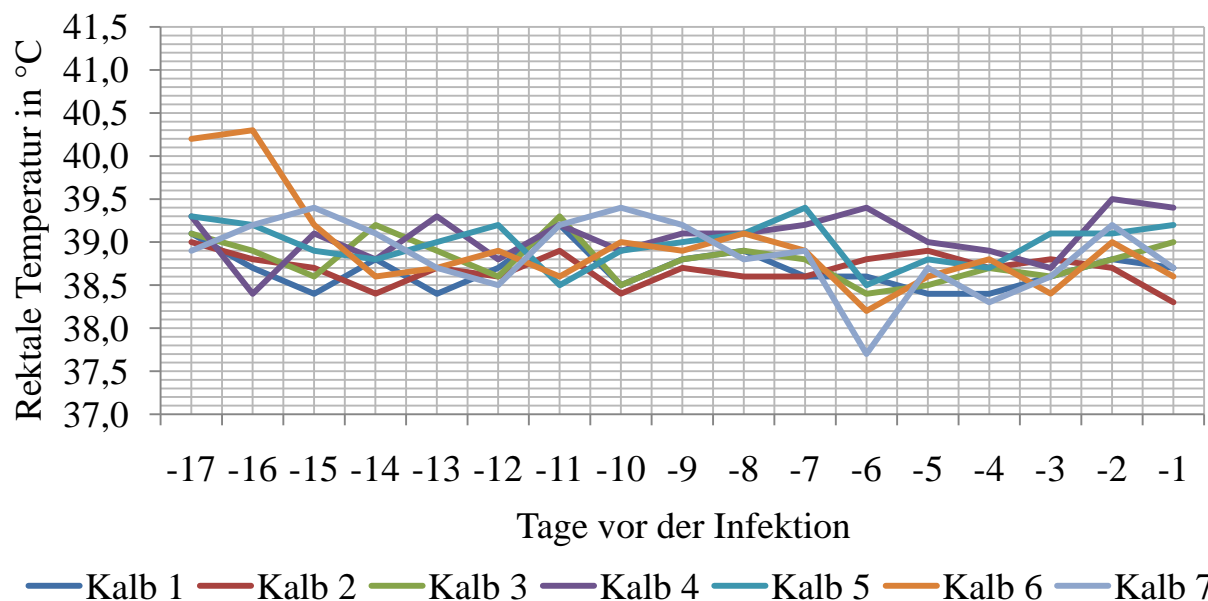
#### 6.1.1. Klinische Befunde

##### 6.1.1.1. Allgemeinzustand, Fresslust und Nährzustand

Der Allgemeinzustand aller Kälber war während der gesamten Untersuchungsdauer ungestört. Ebenso wiesen alle Kälber stets einen guten Nährzustand auf. Die Fresslust war bei vier Kälbern (Nr. 4 bis 7) am zweiten Tag nach der Infektion reduziert. In der übrigen Versuchsphase war die Fresslust bei allen Kälbern normal.

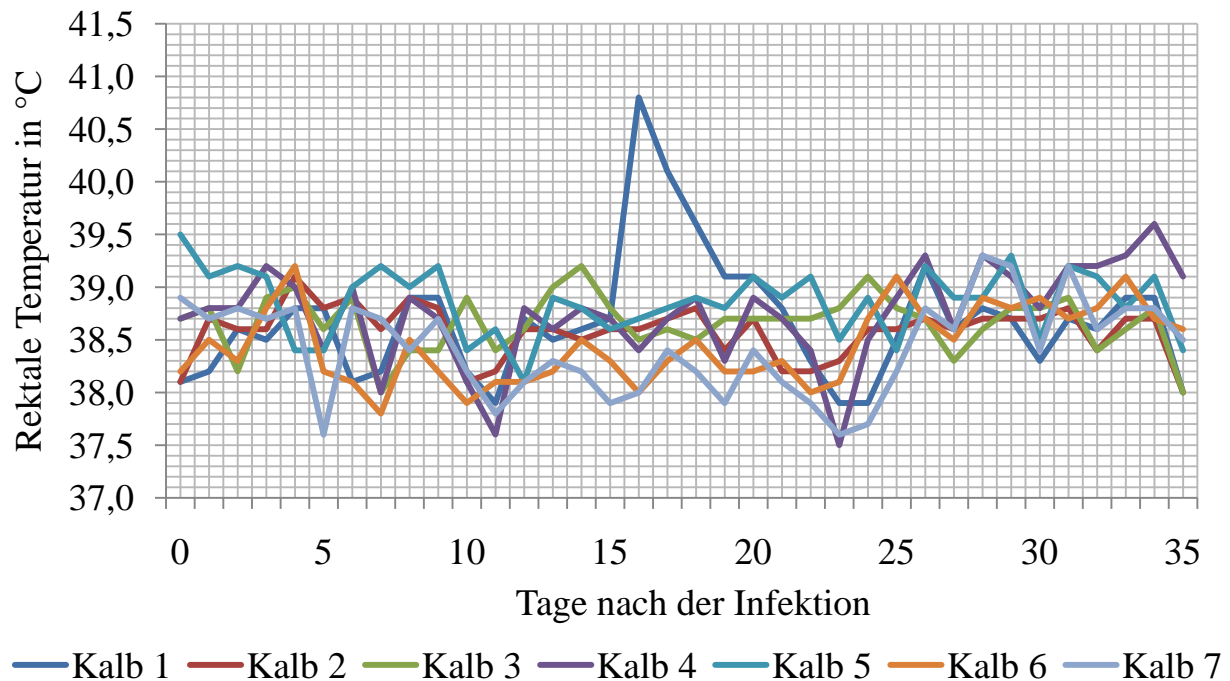
##### 6.1.1.2. Rektale Temperatur

Während der Akklimatisationsphase lag die rektale Temperatur der Kälber zwischen 37.7 und 40.3 °C ( $38.9 \pm 0.36$  °C; Abb. 5) und während der Infektionsphase zwischen 37.5 und 40.8 °C ( $38.6 \pm 0.42$  °C; Abb. 6, Tab. 3). Während der Akklimatisationsphase wiesen die Kälber, mit einer Ausnahme (Kalb 6 an den Tagen -17 und -16), nie eine rektale Temperatur von über 39.5 °C auf.



**Abb. 5:** Rektale Temperatur bei sieben Kälbern während der Akklimatisationsphase

Nach der Infektion zeigten die Kälber, mit Ausnahme des Kalbes 1 an den Tagen 16, 17 und 18 und des Kalbes 4 am Tag 34, ebenfalls keinen Anstieg der rektalen Temperatur über 39.5 °C. Das Kalb 5 wies am Tag der Infektion eine Rektaltemperatur von 39.5 °C auf.



**Abb. 6:** Rektale Temperatur bei 7 Kälbern nach der Infektion mit BD-Virus

**Tab. 3:** Übersicht über die Tage mit erhöhter Rektaltemperatur bei 7 Kälbern nach der Infektion mit BD-Virus

Kalb	Tage nach der Infektion																	
	0	2	3	4	7	9	14	16	17	18	26	27	28	29	31	32	33	34
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		

Leere Felder:  $T < 39.2 \text{ °C}$

Hellgraue Felder:  $T 39.2 - 39.5 \text{ °C}$

Dunkelgraue Felder:  $T 39.6 - 40.0 \text{ °C}$

Schwarze Felder:  $T 40.1 - 41.0 \text{ °C}$

#### **6.1.1.3. Herz- und Kreislaufsystem**

Die Herzfrequenz schwankte während der Akklimatisations- und Infektionsphase zwischen 40 und 108 Schlägen pro Minute ( $66.2 \pm 13.4$  Schläge pro Minute). Die weitere Untersuchung des Herz- und Kreislaufsystems war bei allen Kälbern während der ganzen Zeit unauffällig.

#### **6.1.1.4. Atemapparat**

Die Atemfrequenz lag während der gesamten Untersuchungsphase zwischen 12 und 80 Atemzügen pro Minute ( $25.0 \pm 8.9$  Atemzüge pro Minute). Der Atemtyp war stets kostoabdominal. Bei der Auskultation der Lungen wurde bei sechs Kälbern (Nr. 1, 3 bis 7) sowohl in der Phase vor als auch nach der Infektion an einigen, unterschiedlichen Tagen ein verstärktes vesikuläres Atemgeräusch, teilweise auch ein Giemen festgestellt.

Alle Kälber wiesen an unterschiedlichen Tagen Nasenausfluss von seröser bis muköser Qualität auf. Beim Kalb 1 war dieser nur während der Infektionsphase, bei den restlichen Kälbern während der Akklimatisations- und Infektionsphase zu beobachten.

Fünf Kälber (Nr. 2, 4 bis 7) husteten an einigen Tagen spontan (Nr. 2 nur vor der Infektion, Nr. 4 bis 7 vor und nach der Infektion).

#### **6.1.1.5. Haut und Hautanhangsorgane**

Die Untersuchung der Haut und ihrer Anhangsgebilde war, mit Ausnahme der Befunde am Flotzmaul, bei allen Kälbern während der gesamten Versuchsphase unauffällig. Das Flotzmaul wies während der gesamten Akklimatisationsphase bei keinem Kalb Veränderungen auf. Während der Infektionsphase zeigten sich bei vier Kälbern (Nr. 4 bis 7) Veränderungen, die sich in Form von Erhabenheiten mit schorfartigen Auflagerungen an Ober- und Unterlippe darstellten (Tab. 4). Sie glichen dem klinischen Bild einer Infektion mit *Trichophyton verrucosum*. Im Verlauf konnte die Verdachtsdiagnose einer Trichophytie, aufgrund einer Genera-

lisationstendenz und dem pathognomonischen Erscheinungsbild zusätzlich befallener Gebiete (Kopf und seitlicher Hals), klinisch bestätigt werden.

#### **6.1.1.6. Farbe und Veränderungen der Schleimhäute**

Die Schleimhautfarbe war bei allen Kälbern stets blassrosa. Während der gesamten Akklimatisationsphase waren bei keinem Kalb Veränderungen an den Schleimhäuten aufgetreten. Ab dem 4. Tag nach der Infektion traten bei fünf Kälbern (Nr. 1, 2 und 5 bis 7) Erosionen an der Maulschleimhaut auf (Tab. 5, Abb. 7 bis 10). Sie waren im Bereich der rostralen Gaumenplatte, des incisivalen Gingivaanteils und der Schleimhäute der Ober- und Unterlippe lokalisiert. Sie stellten sich als rundliche oder längliche, leicht gerötete Areale mit Integritätsverlust des Oberflächenepithels dar.

**Tab. 4:** Trichophytie am Flotzmaul bei 7 Kälbern während der Infektionsphase

Kalb	Tage nach der Infektion																																				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
1																																					
2																																					
3																																					
4																																					
5																																					
6																																					
7																																					

Leere Felder: Keine Veränderungen

Graue Felder: Auftreten von Trichophytie

**Tab. 5:** Erosive Schleimhautveränderungen bei 7 Kälbern nach der Infektion mit dem BD-Virus

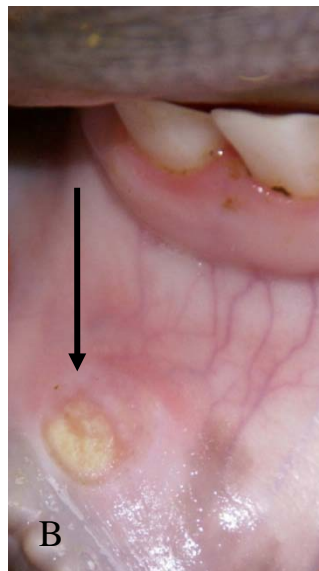
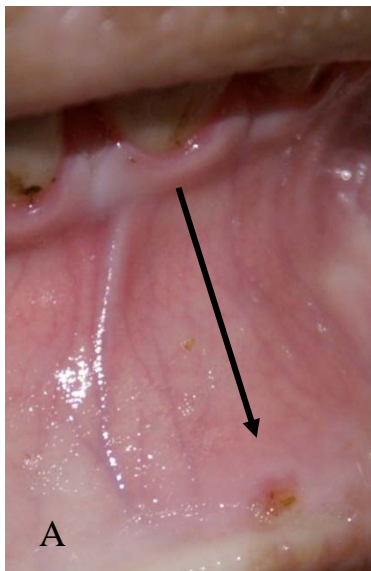
Kalb	Tage nach der Infektion																																					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
1																																						
2																																						
3																																						
4																																						
5																																						
6																																						
7																																						

Leere Felder: Keine Schleimhautveränderungen

Graue Felder: Auftreten von erosiven Schleimhautveränderungen



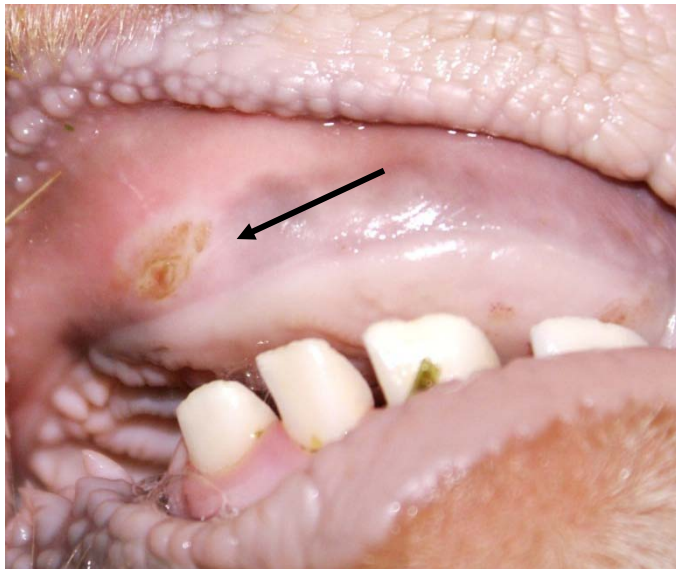
**Abb. 7:** Erosive Veränderung im rostralen Anteil der Gaumenplatte und im Bereich der Oberlippe beim Kalb 5



**Abb. 8:** Erosionen im Bereich der labialen Schleimhaut der Unterlippe bei den Kälbern 1 (A) und 7 (B)



**Abb. 9:** Erosion im Bereich des incisivalen Gingivaanteils beim Kalb 7



**Abb. 10:** Erosion im Bereich der rostralen Gaumenplatte beim Kalb 6

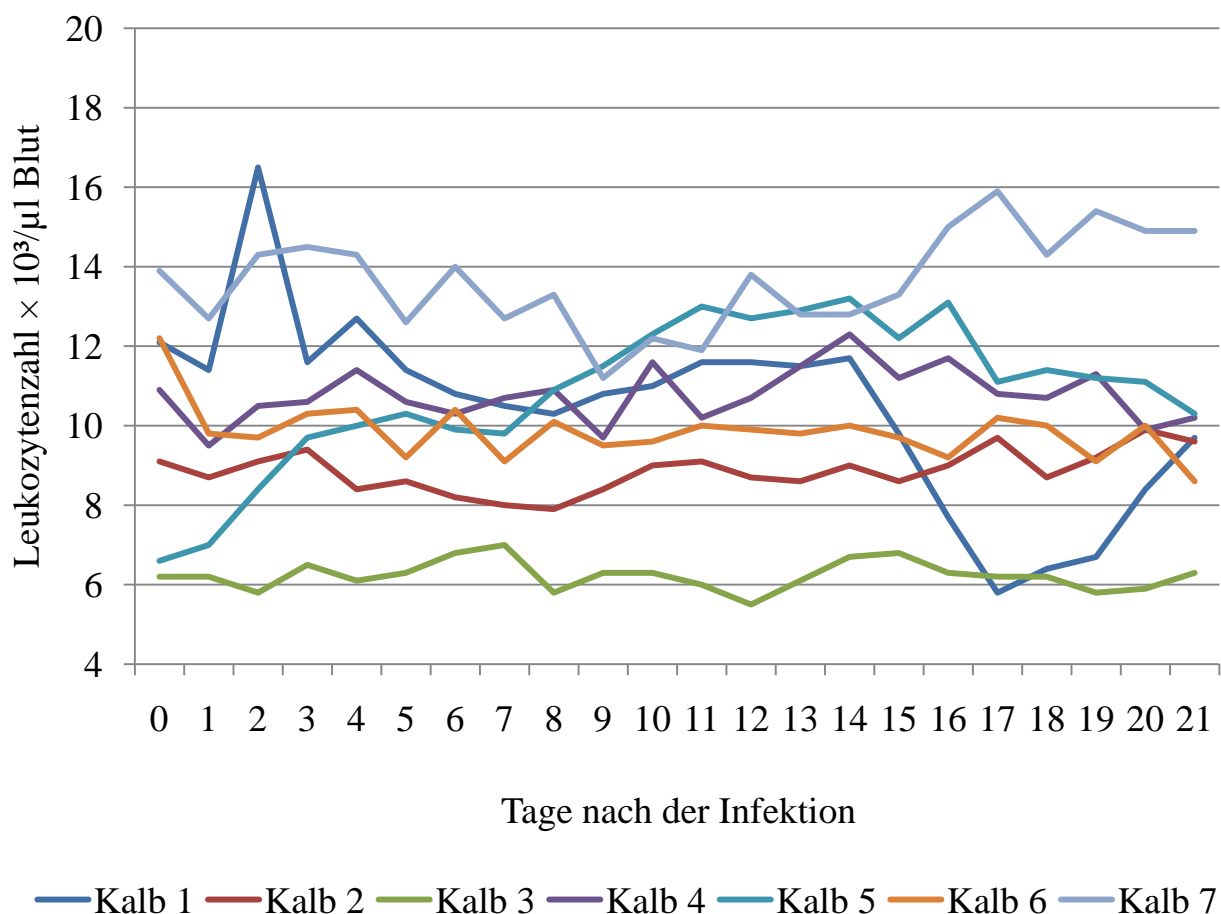
#### **6.1.1.7. Verdauungsapparat**

Bei vier Kälbern (Nr. 1, 5 bis 7) war die Pansen- und Darmmotorik vom 16. bis zum 14. Tag vor der Infektion reduziert. Vier Kälber (Nr. 1 bis 3 und 7) zeigten zu Beginn der Akklimatisationsphase vorübergehend Durchfall. Am Tag vor der Infektion zeigte das Kalb 7 kurzfristig Koliksymptomatik. Die übrige Untersuchung des Verdauungsapparates war bei allen Kälbern immer unauffällig.



### 6.1.2. Hämatologische Untersuchungsergebnisse

Die Gesamtleukozytenkonzentration der Kälber lag zwischen  $4.9$  und  $16.5 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut ( $10.0 \pm 2.49 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut; Abb. 11, Tab. 6). Fünf Kälber (Nr. 1, 2, 4, 6, 7) wiesen am Tag 0 eine Leukozytose, d. h. eine Gesamtleukozytenkonzentration von über  $8.8 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut, auf. Während der ersten 21 Tage nach der Infektion trat bei keinem Kalb eine manifeste Leukopenie auf. Beim Kalb 1 stieg die Leukozytenkonzentration am Tag 2 nach der Infektion kurzfristig deutlich an und fiel nach dem 14. Tag ab. Kalb 5 zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Leukozytenkonzentration zwischen den Tagen 0 und 14 nach der Infektion. Beim Kalb 7 stieg die Leukozytenkonzentration zwischen den Tagen 15 und 17 deutlich an.



**Abb. 11:** Verlauf der Gesamtleukozytenzahl bei 7 Kälbern während der ersten 21 Tage nach der Infektion mit BD-Virus

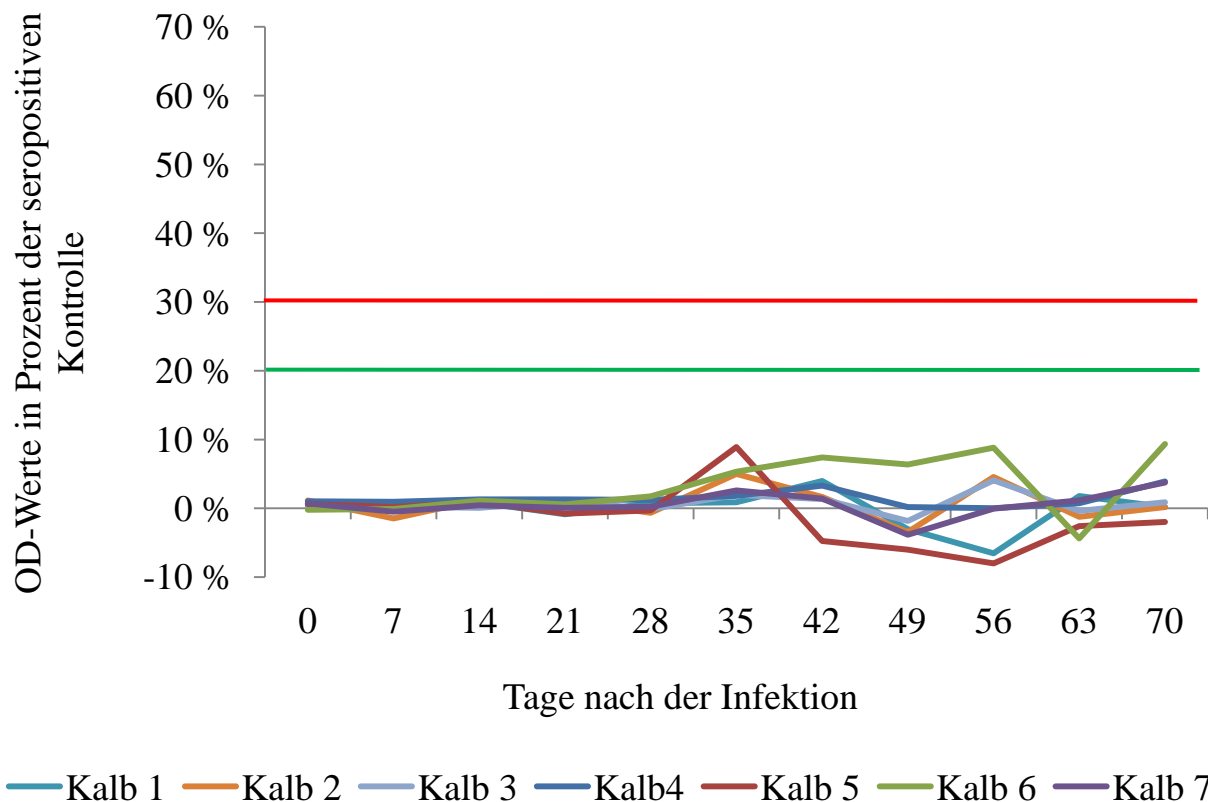
**Tab. 6:** Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen bei 7 Kälbern im Verlauf der Akklimations- und Infektionsphase (Tab. 1)

	Parameter	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (Minimum – Maximum)
Rotes Blutbild	Hämatokrit [%]	$31.9 \pm 3.32$ (24.0 – 42.0)
	Hämoglobin [g/dl]	$10.7 \pm 1.06$ (8.2 – 13.5)
	Erythrozyten [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ]	$9.1 \pm 1.10$ (6.79 – 12.1)
	MCH [pg]	$11.7 \pm 0.93$ (9.0 – 15.0)
	MCHC [g/dl]	$33.5 \pm 1.36$ (27.0 – 41.0)
	MCV [fl]	$35.1 \pm 2.37$ (28.0 – 44.0)
Weisses Blutbild [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]	Gesamtleukozytenkonzentration	$10.0 \pm 2.49$ (4.9 – 16.5)
	Lymphozyten	$6.0 \pm 2.02$ (0.258 – 10.5)
	Neutrophile Granulozyten	$2.0 \pm 0.90$ (0.531 – 5.25)
	Eosinophile Granulozyten	$0.1 \pm 0.21$ (0.0 – 2.32)
	Basophile Granulozyten	$0.1 \pm 0.04$ (0.0 – 0.28)
	Monozyten	$0.9 \pm 0.47$ (0.116 – 3.150)

### 6.1.3. Serologische Untersuchung auf Border-Disease

#### 6.1.3.1. ELISA

Mittels ELISA konnte bei keinem Kalb eine Serokonversion nachgewiesen werden. Die OD-Werte schwankten zwischen -8.0 und 9.3 % ( $0.8 \pm 3.10$  %) der positiven Kontrolle (Abb. 12). Nach einem ausgeglichenen Verlauf zwischen den Tagen 0 und 28 nach der Infektion ( $0.0 \pm 2.0$  %) zeigten die OD-Werte nach dem Tag 28 deutliche Schwankungen. Der OD-Wert von Kalb 6 lag am Tag 70 bei 9.3 %.



**Abb. 12:** Verlauf der OD-Werte bei 7 Kälbern nach der Infektion mit BD-Virus. OD-Werte über 20 % wurden als verdächtig (horizontale grüne Linie), solche über 30 % als positiv (horizontale rote Linie) beurteilt.

#### 6.1.3.2. Serumneutralisationstest

Ein Kalb (Nr. 6) wies am 70. Tag nach der Infektion spezifische, neutralisierende Antikörper gegen das Border-Disease-Virus auf. Der Antikörpertiter lag bei 1:422.

#### 6.1.4. Virologische Untersuchungsergebnisse

##### 6.1.4.1. Virusnachweis im Blut

Bei drei Kälbern (Nr. 1, 2, 7) konnte zwischen dem 8. und 21. Tag nach der Infektion an einem bis drei unterschiedlichen Tagen virale RNA aus dem Blut isoliert werden (Tab. 7). Der Virusnachweis gelang jeweils bei der Erstuntersuchung der Proben, während die Zweituntersuchung der gleichen Proben 7 bis 9 Wochen nach deren Entnahme immer negativ war. Die CT-Werte lagen zwischen 34.4 und 38.2 ( $36.2 \pm 1.55$ ).

#### 6.1.4.2. Virusnachweis in Nasentupferproben

In der Nasentupferprobe des Kalbes 4 konnte am 14. Tag der Infektionsphase virale RNA nachgewiesen werden (Tab. 7). Der CT-Wert des Isolates lag bei 37.4. Bei der nochmaligen Untersuchung der Probe 8 Wochen später war der Nachweis viraler RNA negativ.

**Tab. 7:** Nachweis von viraler RNA aus EDTA-Blut und Nasentupfern von 7 Kälbern nach der Infektion mit BD-Virus

Kalb	Material	Tage nach der Infektion						
		0	8	9	10	11	14	21
1	Blut							
	Tupfer							
2	Blut							
	Tupfer							
3	Blut							
	Tupfer							
4	Blut							
	Tupfer							
5	Blut							
	Tupfer							
6	Blut							
	Tupfer							
7	Blut							
	Tupfer							

Blut = EDTA-Blut, Tupfer = Nasentupfer

Leere Felder: Kein Nachweis von viraler RNA

Graue Felder: Positiver Nachweis von viraler RNA

#### 6.1.4.3. Virusnachweis in Tupferproben von Erosionen

Die Tupferproben der Erosionen waren virusnegativ.

## 6.2. Ziegen (Tiergruppe B)

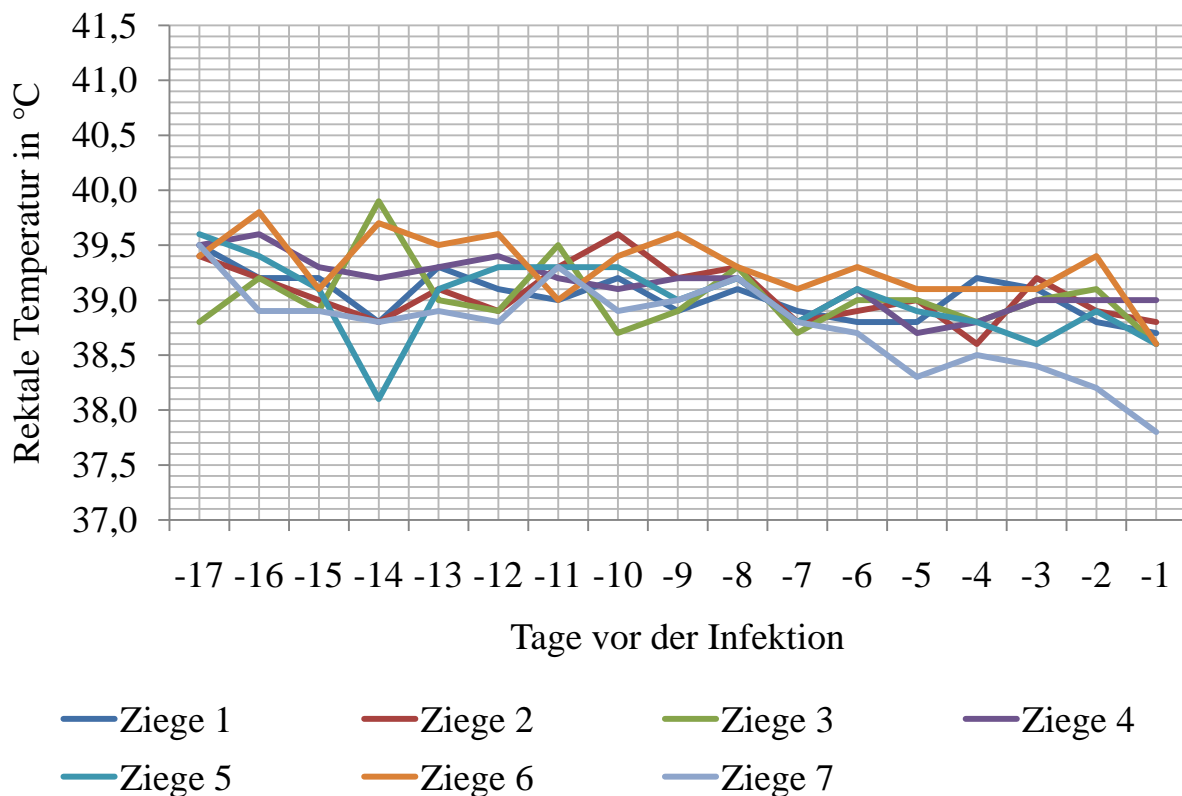
### 6.2.1. Klinische Befunde

#### 6.2.1.1. Allgemeinzustand, Fresslust und Nährzustand

Die Ziegen zeigten während der gesamten Untersuchungsdauer stets einen ungestörten Allgemeinzustand, gute Fresslust und einen guten Nährzustand.

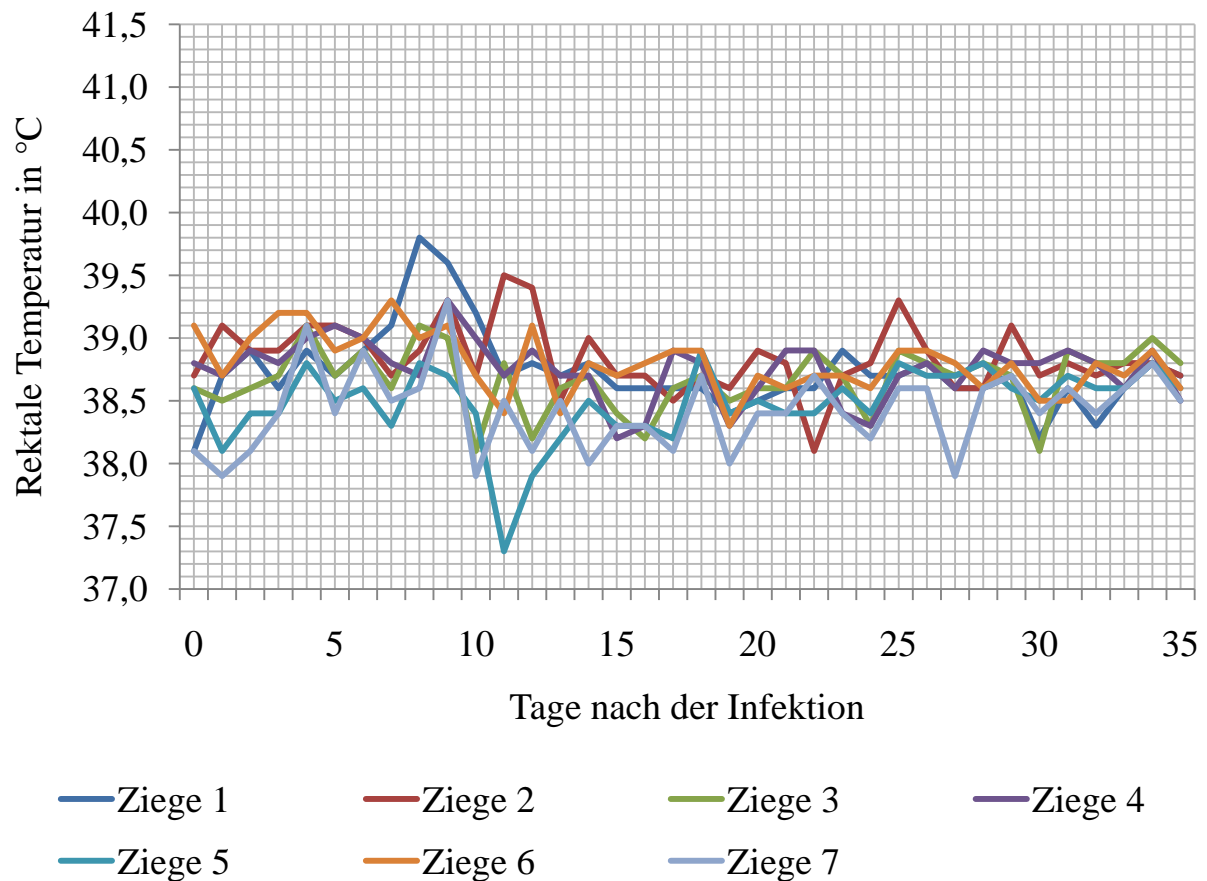
#### 6.2.1.2. Rektale Temperatur

In der Akklimatisationsphase lag die rektale Temperatur der Ziegen zwischen 37.8 und 39.9 °C ( $39.1 \pm 0.34$  °C; Abb. 13) und während der Infektionsphase zwischen 37.3 und 39.8 °C ( $38.7 \pm 0.31$  °C; Abb. 14). Fünf Ziegen (Nr. 2 bis 6) zeigten zwischen dem 17. und 9. Tag der Akklimatisationsphase an verschiedenen Tagen eine rektale Körpertemperatur von über 39.5 °C. Ab dem 8. Tag der Akklimatisationsphase bis zur Infektion wiesen alle Ziegen eine rektale Temperatur von weniger als 39.5 °C auf.



**Abb. 13:** Rektale Temperatur bei 7 Ziegen während der Akklimatisationsphase

Nach der Infektion zeigten 6 Ziegen (Nr. 2 bis 7) keinen Anstieg der rektalen Temperatur auf über 39.5 °C. Die Ziege 1 wies am 8. Tag nach der Infektion eine rektale Temperatur von 39.8 °C und am 9. Tag eine solche von 39.6 °C auf.



**Abb. 14:** Rektale Temperatur bei 7 Ziegen nach der Infektion mit BD-Virus

### 6.2.1.3. Herz- und Kreislaufsystem

Die Herzfrequenz der Ziegen schwankte zwischen 46 und 160 Schlägen pro Minute ( $103.3 \pm 14.3$  Schläge pro Minute). Während der Akklimatisationsphase, zwischen den Tagen -17 und -2, wurde bei allen Ziegen, an verschiedenen Tagen eine Herzarrhythmie festgestellt. Die übrige Untersuchung des Herz- und Kreislaufsystems war während der gesamten Untersuchungsphase bei allen Ziegen unauffällig.

#### 6.2.1.4. Atemapparat

Die Atemfrequenz der Ziegen lag während der gesamten Untersuchungsdauer zwischen 16 und 80 Atemzügen pro Minute ( $38.1 \pm 10.6$  Atemzüge pro Minute). Der Atemtyp war stets kostoabdominal und die Auskultation der Lungen ohne besonderen Befund. Sowohl während der Akklimatisations- als auch während der Infektionsphase traten teilweise spontaner Husten und Nasenausfluss unterschiedlicher Qualität auf (Tab. 8).

**Tab. 8:** Zeitliches Auftreten von Nasenausfluss und spontanem Husten bei 7 Ziegen vor und nach der Infektion mit BD-Virus

Ziege	Para- meter	Akklimatisations- phase					Infektionsphase													
		-16	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	13	14	15	16
1	NA																			
	H																			
2	NA																			
	H																			
3	NA																			
	H																			
4	NA																			
	H																			
5	NA																			
	H																			
6	NA																			
	H																			
7	NA																			
	H																			

NA Nasenausfluss, H spontaner Husten

Leere Felder: Kein Nasenausfluss bzw. kein spontaner Husten

Hellgraue Felder: Seröser Nasenausfluss

Dunkelgraue Felder: Muköser Nasenausfluss

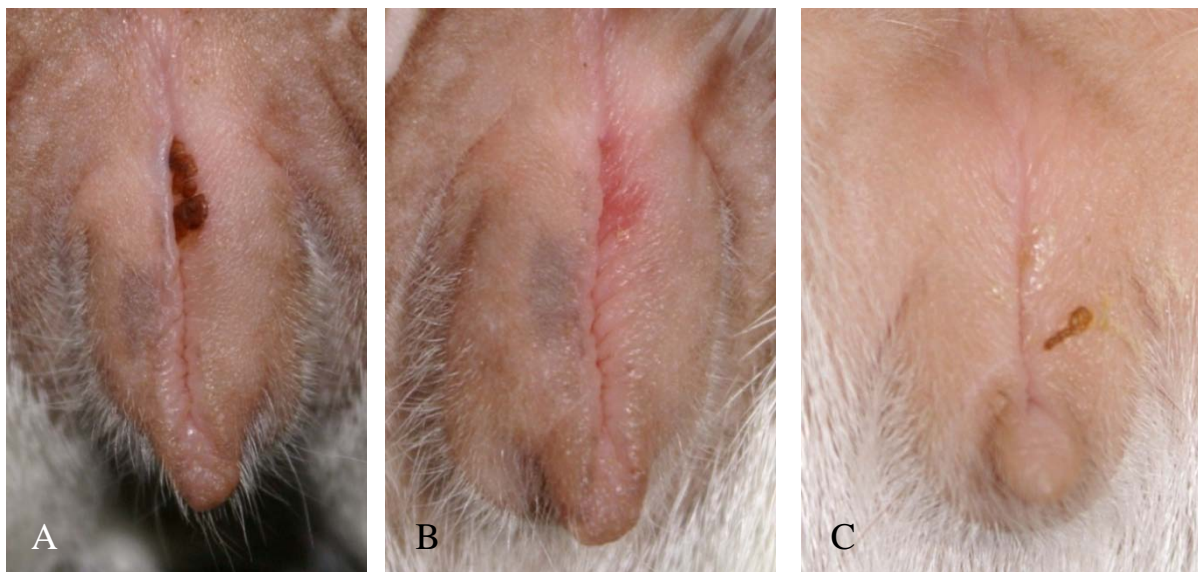
Schwarze Felder: Husten

#### 6.2.1.5. Haut und Hautanhangsorgane

Die Untersuchung der Haut und ihrer Anhangsorgane war während der gesamten Untersuchungsdauer bei allen Ziegen unauffällig.

#### 6.2.1.6. Farbe und Veränderungen der Schleimhäute

Zwei Ziegen (Nr. 6 und 7) zeigten nach der Infektion Veränderungen im Bereich der Vulva. Bei der Ziege 6 wurde am fünften Tag nach der Infektion eine schorfige Veränderung von mittelgradiger Ausprägung am dorsalen Vulvawinkel festgestellt (Abb. 15 A). Sie befand sich am Übergang der äusseren Haut zur Vulvaschleimhaut. Die oberflächliche Schorfauflagerung liess sich nur mit Integritätsverlust des darunterliegenden Oberflächenepithels entfernen (Abb. 15 B). Die Läsion heilte bis zum folgenden Tag vollständig ab. Eine ähnliche Veränderung zeigte sich bei der Ziege 7 am 19. Tag nach der Infektion (Abb. 15 C). Sie war ebenfalls im dorsalen Vulvawinkel lokalisiert und wies eine geringgradige Ausprägung auf. An den übrigen Tagen war die Untersuchung der Schleimhäute bei allen Ziegen unauffällig.



**Abb. 15:** Erosive Veränderungen im Bereich der Vulva mit krustösen Auflagerungen bei den Ziegen 6 (A und B, mittelgradig; A, vor Entfernung der Kruste; B, nach Entfernung der Kruste) und 7 (C, leichtgradig)

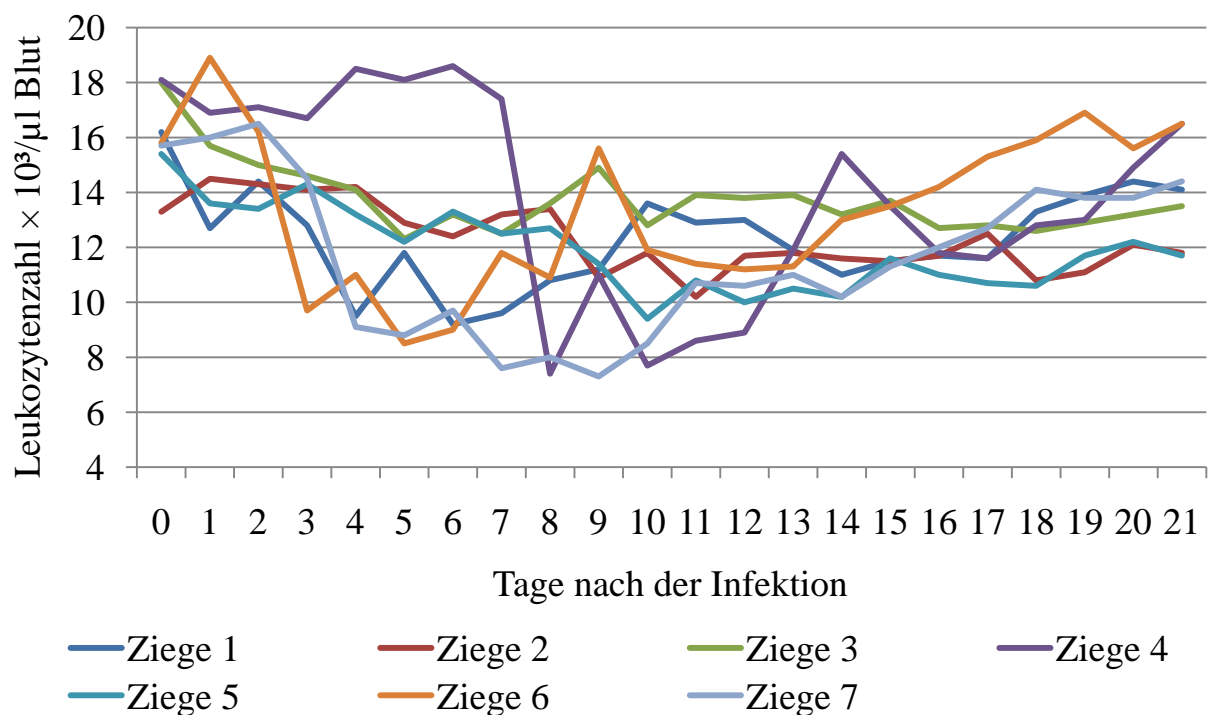


### 6.2.1.7. Verdauungsapparat

Bei fünf Ziegen (Nr. 3 bis 7) lag während der initialen Akklimatisationsphase, vom 17. bis zum 14. Tag, eine reduzierte Pansen- oder Darmmotorik vor. Die übrigen Untersuchungen des Verdauungsapparates waren während der gesamten Untersuchungsphase bei allen Ziegen unauffällig.

### 6.2.2. Hämatologische Untersuchungsergebnisse

Die Gesamtleukozytenkonzentration der Ziegen lag zwischen  $7.3$  und  $19.8 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut ( $13.0 \pm 2.36 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut; Abb. 16, Tab. 9). Am Tag 0 wiesen alle Ziegen eine Leukozytenkonzentration im Normbereich auf ( $7.8 - 19.6 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut; TSCHUOR et al., 2008). Während der ersten 21 Tage nach der Infektion wichen die Gesamtleukozytenkonzentrationen, mit Ausnahme derjenigen der Ziegen 4 und 7, nicht vom Referenzbereich ab. Die Ziege 4 wies an den Tagen 8 und 10, die Ziege 7 an den Tagen 7 und 9 eine leichtgradige Leukopenie, d. h. eine Leukozytenkonzentrationen von weniger als  $7.8 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut, auf.



**Abb. 16:** Verlauf der Gesamtleukozytenzahl bei 7 Ziegen während der ersten 21 Tage nach der Infektion mit BD-Virus

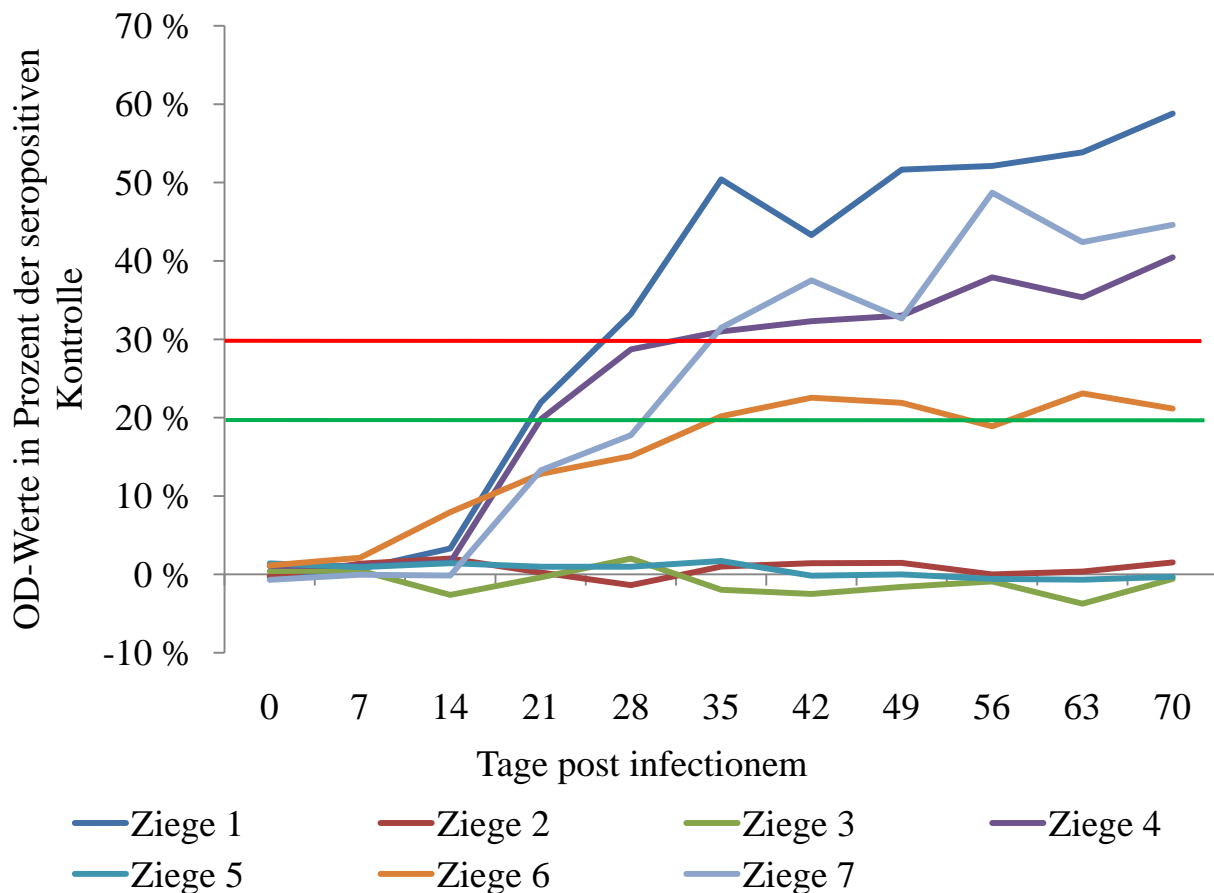
**Tab. 9:** Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen bei 7 Ziegen im Verlauf der Akklimatisations- und Infektionsphase (Tab. 1)

	Parameter	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (Minimum – Maximum)
Rotes Blutbild	Hämatokrit [%]	$27.4 \pm 3.45$ (22.0 – 38.0)
	Hämoglobin [g/dl]	$9.4 \pm 0.98$ (7.7 – 12.0)
	Erythrozyten [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ]	$16.2 \pm 1.55$ (12.9 – 20.1)
	MCH [pg]	$5.9 \pm 0.25$ (5.0 – 6.0)
	MCHC [g/dl]	$34.3 \pm 1.72$ (25.0 – 39.0)
	MCV [fl]	$16.9 \pm 1.10$ (15.0 – 21.0)
Weisses Blutbild [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]	Gesamtleukozytenkonzentration	$13.0 \pm 2.36$ (7.3 – 19.8)
	Lymphozyten	$4.8 \pm 1.86$ (1.24 – 11.9)
	Neutrophile Granulozyten	$4.9 \pm 1.38$ (0.0 – 9.94)
	Eosinophile Granulozyten	$0.1 \pm 0.09$ (0.0 – 0.499)
	Basophile Granulozyten	$0.0 \pm 0.07$ (0.0 – 0.685)
	Monozyten	$0.5 \pm 0.34$ (0.019 – 2.07)

### 6.2.3. Serologische Untersuchung auf Border-Disease

#### 6.2.3.1. ELISA

Mittels ELISA konnte bei drei Ziegen (Nr. 1, 4, 7) zwischen den Tagen 21 und 35 nach der Infektion eine Serokonversion nachgewiesen werden (Abb. 17). Die Ziege 6 zeigte ab dem 35. Tag post infectionem antikörperverdächtige OD-Werte. Die Ziegen 2, 3 und 5 blieben stets seronegativ. Die OD-Werte lagen zwischen -3.7 und 58.8 % ( $13.9 \pm 18.12$  %; Abb. 17).



**Abb. 17:** Verlauf der OD-Werte bei 7 Ziegen nach der Infektion mit BD-Virus. OD-Werte über 20 % wurden als verdächtig (horizontale grüne Linie), solche über 30 % als positiv (horizontale rote Linie) beurteilt.

#### 6.2.3.2. Serumneutralisationstest

Am Tag 70 nach der Infektion hatten vier Ziegen (Nr. 1, 4, 6, 7) spezifische, neutralisierende Antikörper gegen das Border-Disease-Virus gebildet. Die genauen Antikörpertiter von Ziege 1 und 7 wurden bestimmt. Sie lagen bei 1:4600 bzw. 1:4200.

#### 6.2.4. Virologische Untersuchungsergebnisse

##### 6.2.4.1. Virusnachweis im Blut

Bei vier Ziegen (Nr. 1, 4, 6 und 7) konnte zwischen dem 4. und 25. Tag nach der Infektion virale RNA aus dem Blut isoliert werden (Tab. 10). Der Nachweis gelang in 8 Proben nur bei der erstmaligen Untersuchung der betreffenden Proben. In

20 Proben konnte die virale RNA auch bei der nochmaligen Untersuchung der gleichen Probe 7 bis 9 Wochen später nachgewiesen werden. Die CT-Werte lagen zwischen 31.0 und 44.1 ( $37.8 \pm 2.84$ ).

#### 6.2.4.2. Virusnachweis in Nasentupferproben

In den Nasentupferproben der Ziegen 5 und 6 konnte virale RNA jeweils an einem Tag nachgewiesen werden (Tab. 10). Bei der Ziege 5 war dies am 9. Tag nach der Infektion mit einem CT-Wert von 37.3 und bei der Ziege 6 am 10. Tag nach der Infektion mit einem CT-Wert von 41.1 der Fall. Neun Wochen später war der Virusnachweis beider Nasentupferproben negativ.

**Tab. 10:** Nachweis von viraler RNA aus EDTA-Blut und Nasentupfern von 7 Ziegen nach der Infektion mit BD-Virus

Ziege	Material	Tage nach der Infektion																			
		0	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	25	
1	Blut																				
	Tupfer																				
2	Blut																				
	Tupfer																				
3	Blut																				
	Tupfer																				
4	Blut																				
	Tupfer																				
5	Blut																				
	Tupfer																				
6	Blut																				
	Tupfer																				
7	Blut																				
	Tupfer																				

Blut = EDTA-Blut, Tupfer = Nasentupfer

Leere Felder: Kein Nachweis von viraler RNA

Hellgraue Felder: Nachweis von viraler RNA bei der Erstuntersuchung der Probe

Dunkelgraue Felder: Zweimaliger Nachweis von viraler RNA bei der Erst- und bei der nochmaligen Untersuchung der Probe 7 bis 9 Wochen (Blut) bzw. 9 Wochen (Tupfer) später

#### 6.2.4.3. Virusnachweis in Tupferproben von Schleimhautveränderungen

Die Tupferproben der Schleimhautveränderungen waren virusnegativ.

### 6.3. Schafe (Tiergruppe C)

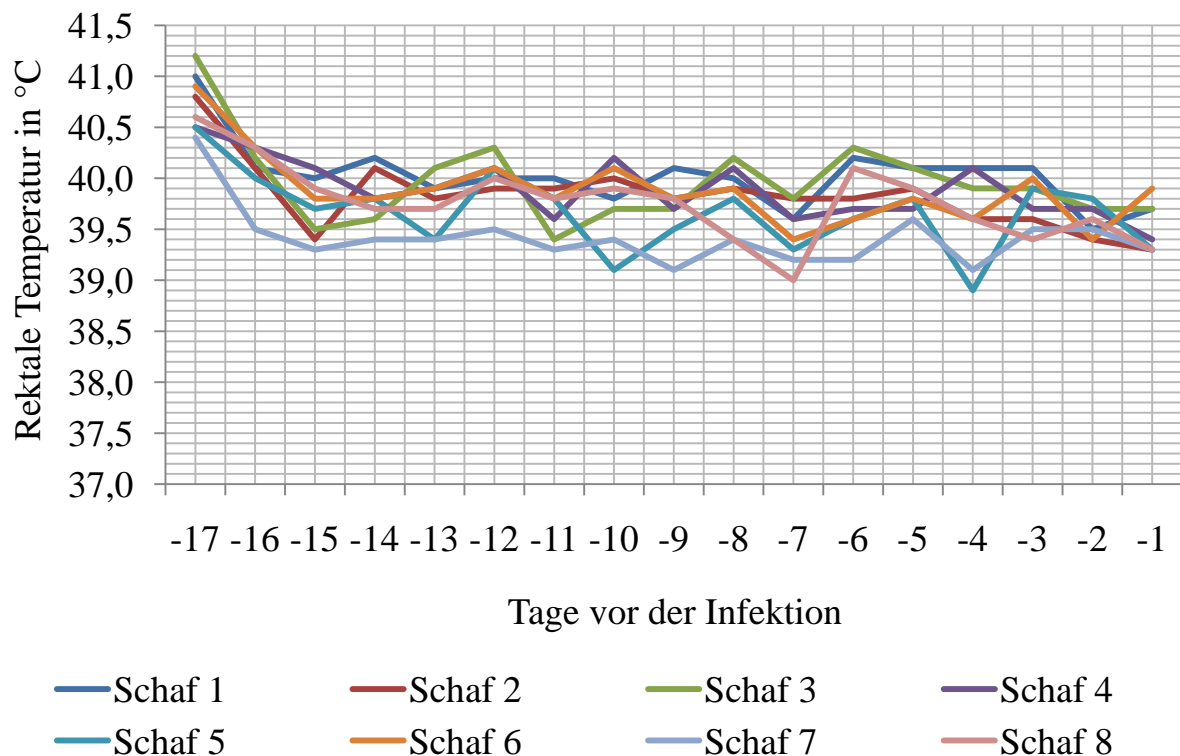
#### 6.3.1. Klinische Befunde

##### 6.3.1.1. Allgemeinzustand, Fresslust und Nährzustand

Die Untersuchung von Allgemeinzustand, Fresslust und Nährzustand ergab während des gesamten Untersuchungszeitraums bei keinem Schaf Abweichungen von der Norm.

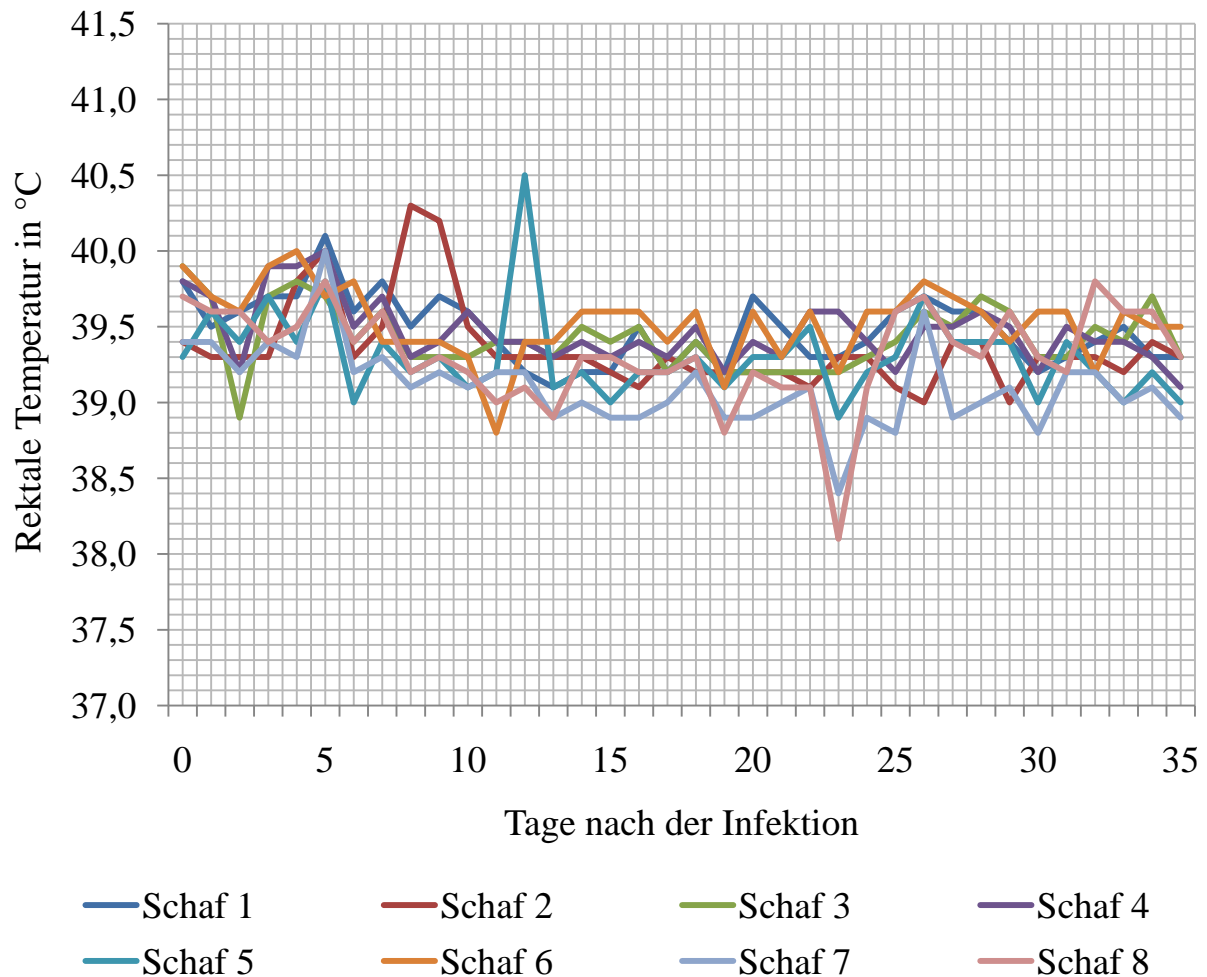
##### 6.3.1.2. Rektale Temperatur

Die rektale Temperatur der Schafe lag während der Akklimatisationsphase zwischen 38.9 und 41.2 °C ( $39.8 \pm 0.39$  °C; Abb. 18) und während der Infektionsphase zwischen 38.1 und 40.5 °C ( $39.4 \pm 0.29$  °C; Abb. 19). Am ersten Tag der Akklimatisationsphase wiesen alle Schafe eine rektale Temperatur von über 40.3 °C auf. An den weiteren Tagen der Akklimatisationsphase war die rektale Temperatur bei keinem Schaf über 40.3 °C.



**Abb. 18:** Rektale Temperatur bei 8 Schafen während der Akklimatisationsphase

Nach der Infektion zeigten 5 Schafe (Nr. 3, 4, 6 bis 8) keinen Anstieg der rektalen Temperatur auf über 40.0 °C. Das Schaf 1 wies am Tag 5, das Schaf 2 an den Tagen 8 und 9 und das Schaf 5 am Tag 12 eine Rektaltemperatur von über 40.0 °C auf.



**Abb. 19:** Rektale Temperatur bei 8 Schafen nach der Infektion mit BD-Virus

### 6.3.1.3. Herz- und Kreislaufsystem

Die Herzfrequenz der Schafe lag zwischen 46 und 200 Schlägen pro Minute ( $114.0 \pm 20.9$  Schläge pro Minute). Die Untersuchungen des Herz- und Kreislaufsystems ergaben keine Auffälligkeiten.

#### **6.3.1.4. Atemapparat**

Die Atemfrequenz der Schafe lag während der gesamten Untersuchungsphase zwischen 20 und 164 Atemzügen pro Minute ( $76.0 \pm 27.8$  Atemzüge pro Minute). Das Schaf 3 zeigte an den Tagen -17 und -4 der Akklimatisationsphase serösen bzw. mukösen Nasenausfluss. Ansonsten wurde am Atemapparat keine Abweichung von den Normalbefunden festgestellt.

#### **6.3.1.5. Maul**

Vom ersten Tag nach der Infektion an traten bei 4 Schafen (Nr. 4 bis 6 und 8) Veränderungen am Maul auf. Solche Veränderungen zeigten sich als bis zu linsengrosse Erhabenheiten an der Ober- oder Unterlippe, meist in unmittelbarer Nähe zum Übergang von der kutanen Haut zur labialen Schleimhaut. Sie besaßen in der Regel schorfartige Auflagerungen, welche nur unter Substanzverlust entfernt werden konnten. Nach Entfernung der Auflagerungen stellte sich das darunterliegende Gewebe trichterförmig vertieft und mit Integritätsverlust des Oberflächenepithels dar. Die Veränderungen waren bei den Schafen 4 bis 6 gering- und mittelgradig, beim Schaf 8 stets geringgradig (Tab. 11). Als geringgradig wurden einzelne Veränderungen an der Ober- oder Unterlippe eingestuft, als mittelgradig mehrere solche Veränderungen und als hochgradig Veränderungen, die das gesamte Maul betrafen (Abb. 20 bis 22).

#### **6.1.3.6. Vulva**

Bei 6 Schafen (Nr. 2 bis 4 und 6 bis 8) traten zwischen den Tagen 2 und 35 nach der Infektion Veränderungen im Bereich der unmittelbaren Vulvaumgebung und des ventralen Vulvawinkels auf (Tab. 11, Abb. 20 bis 22). Ihr Schweregrad reichte von gering- bis hochgradig. Bei geringgradiger Ausprägung konnten vereinzelt schorfartige Auflagerungen festgestellt werden. Bei mittelgradigen Veränderungen waren mehrere oder flächigere schorfartige Auflagerungen sichtbar. Bei gering- und mittelgradigen Veränderungen waren nach Ablösung der schorfartigen Aufla-

gerungen makroskopisch teils Unregelmässigkeiten des oberflächlichen Epithels festzustellen. Bei hochgradigen Veränderungen waren Nekrosen, vor allem im Bereich des ventralen Vulvawinkels sichtbar.

Die Veränderungen waren bei den Schafen 7 und 8 stets geringgradig, bei den Schafen 2 bis 4 und 6 auch mittel- und hochgradig.

**Tab. 11:** Veränderungen an Maul und Vulva bei 8 Schafen nach der Infektion mit BD-Virus

Schaf	Organ	Tage nach der Infektion																																				
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
1	M																																					
	V																																					
2	M																																					
	V																																					
3	M																																					
	V																																					
4	M																																					
	V																																					
5	M																																					
	V																																					
6	M																																					
	V																																					
7	M																																					
	V																																					
8	M																																					
	V																																					

M Maul, V Vulva

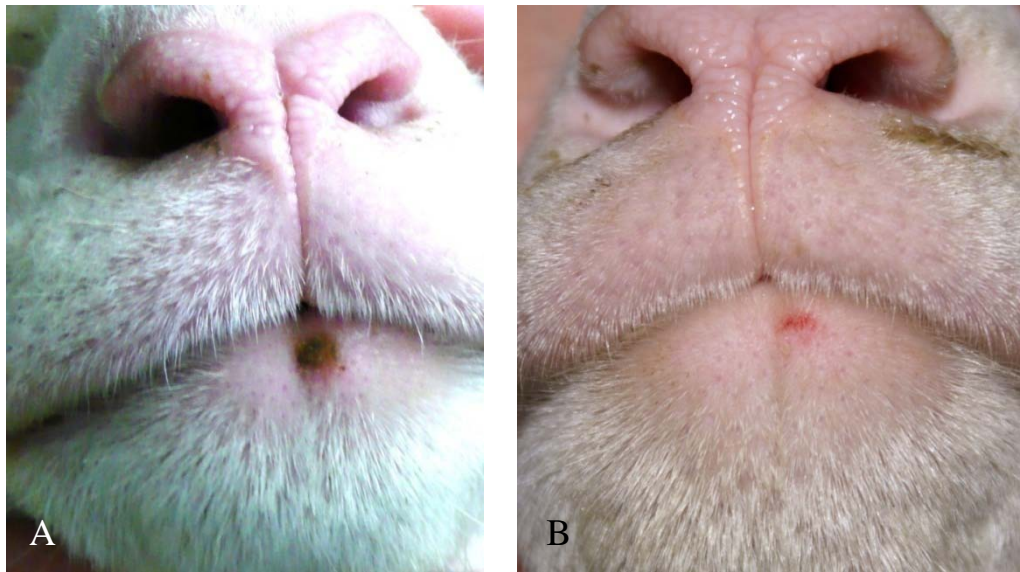
Leere Felder: Keine Veränderungen

Hellgraue Felder: Geringgradige Veränderungen

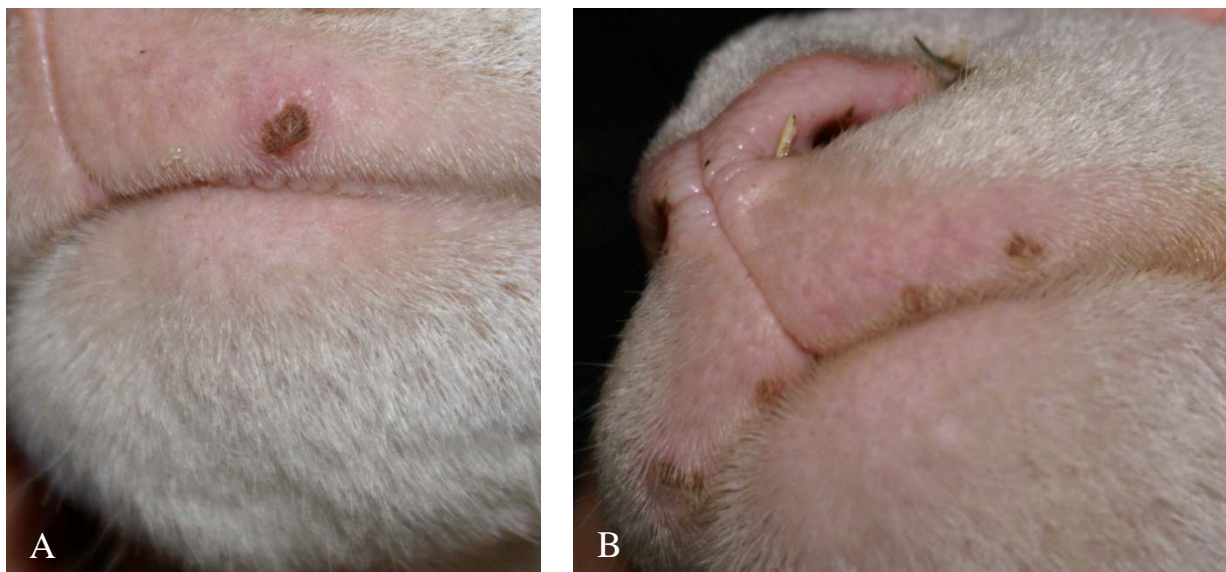
Dunkelgraue Felder: Mittelgradige Veränderungen

Schwarze Felder: Hochgradige Veränderungen

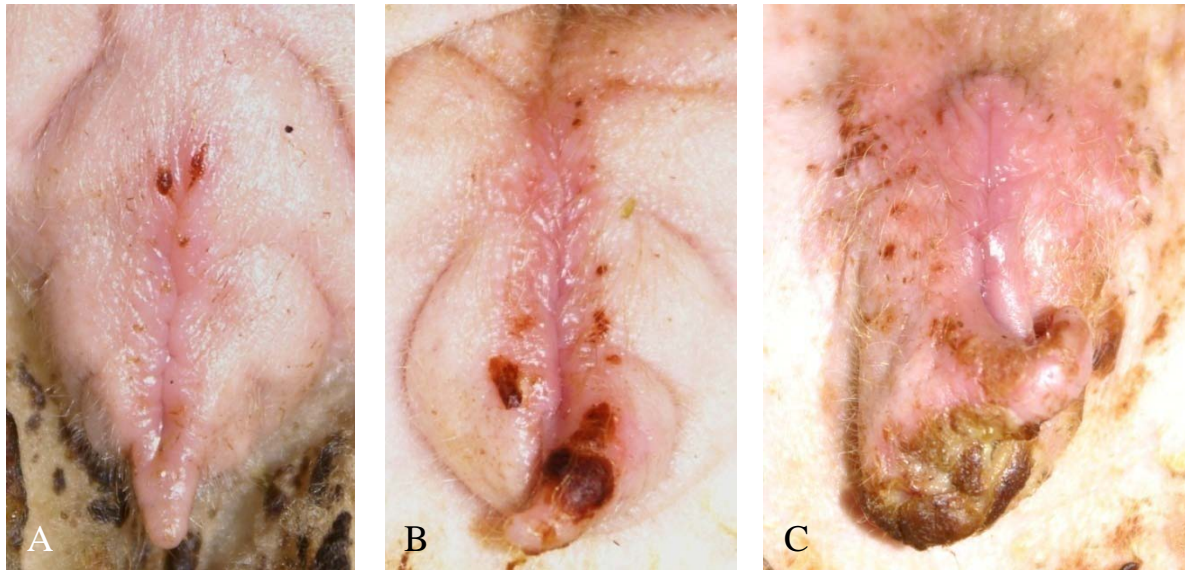




**Abb. 20:** Geringgradige erosive Veränderung im Bereich der Unterlippe beim Schaf 8 vor (A) und nach (B) Entfernung eines schorfartigen Oberflächenbelags



**Abb. 21:** Veränderungen mit schorfartigen Auflagerungen bei den Schafen 4 (A, geringgradig) und 6 (B, mittelgradig)



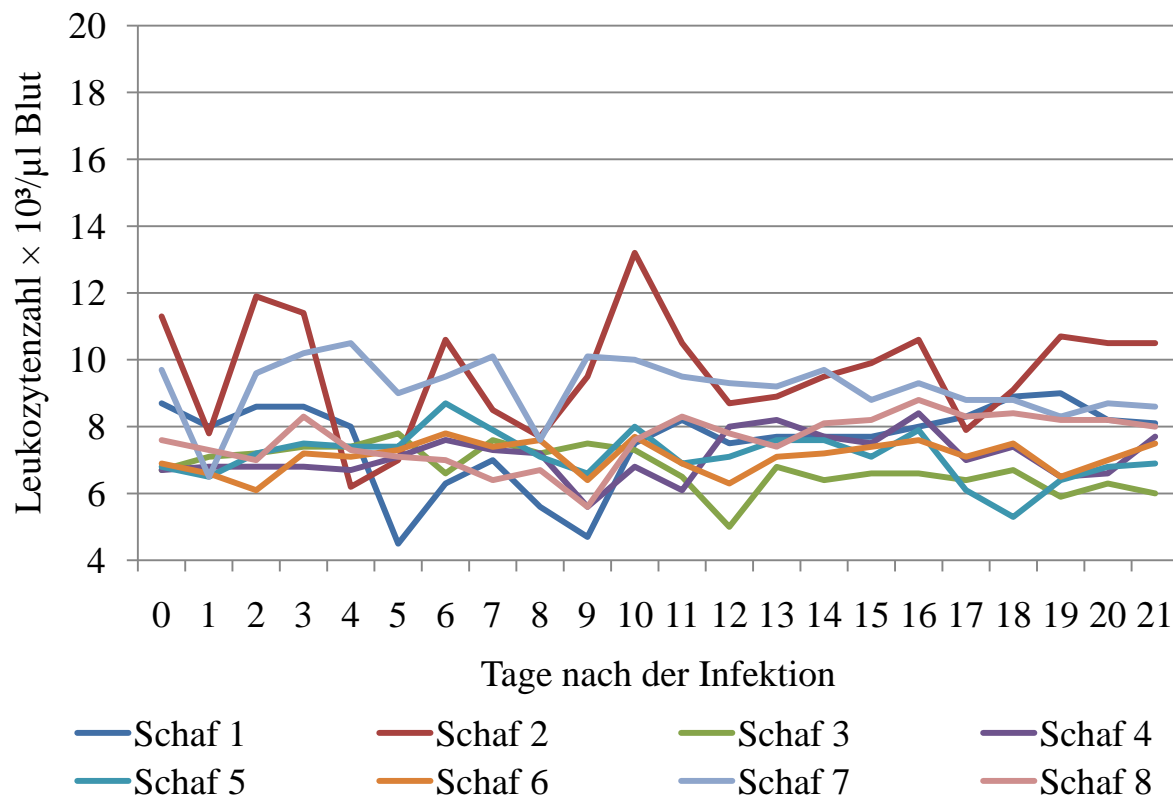
**Abb. 22:** Leicht- (A), mittel- (B) und hochgradige (C) Veränderungen im Bereich der Vulva bei den Schafen 7, 2 und 4 (von links nach rechts)

#### **6.1.3.7. Verdauungsapparat**

Bei sechs Schafen (Nr. 1, 3 bis 5, 7, 8) war die Pansen- oder Darmmotorik an den Tagen -17 bis -14 der Akklimatisationsphase reduziert.

#### **6.3.2. Hämatologische Untersuchungsergebnisse**

Die Gesamtleukozytenkonzentration der Schafe lag zwischen  $4.5$  und  $13.2 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut ( $7.7 \pm 1.36 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut; Abb. 23, Tab. 12). Alle Schafe zeigten am Tag 0 eine Leukozytenkonzentration innerhalb des Referenzbereiches ( $4.5 - 11.4 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut; TSCHUOR et al., 2008). Mit Ausnahme des Schafes 2 wiesen alle Schafe während der ersten 21 Tage nach der Infektion normale Leukozytenkonzentrationen auf. Das Schaf 2 zeigte während dieser Zeit an den Tagen 2 und 10 eine milde Leukozytose.



**Abb. 23:** Verlauf der Gesamtleukozytenzahl bei 8 Schafen während der ersten 21 Tage nach der Infektion mit BD-Virus

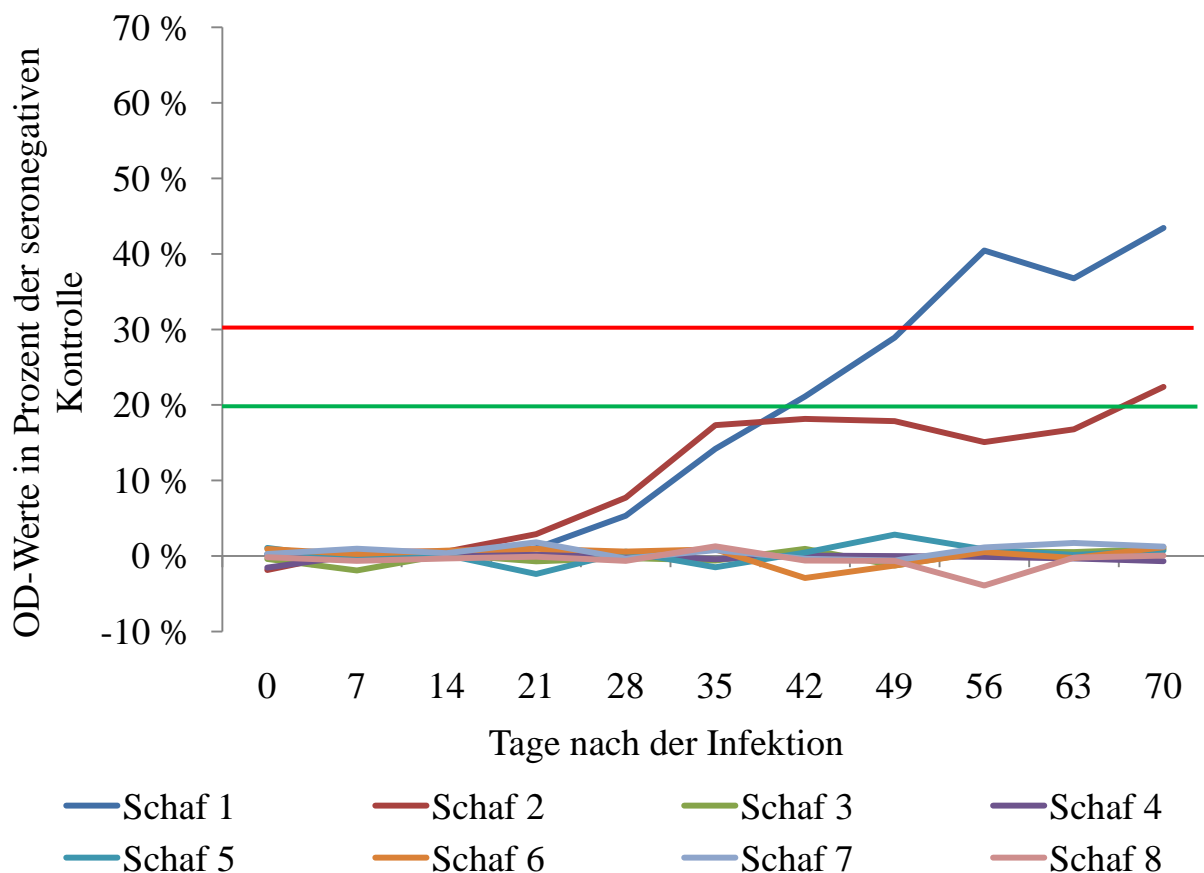
**Tab. 12:** Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen bei 8 Schafen im Verlauf der Akklimations- und Infektionsphase (Tab. 1)

	Parameter	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (Minimum – Maximum)
Rotes Blutbild	Hämatokrit [%]	$29.3 \pm 2.50$ (23.0 – 37.0)
	Hämoglobin [g/dl]	$10.4 \pm 0.81$ (8.5 – 12.4)
	Erythrozyten [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ]	$10.2 \pm 0.92$ (8.04 – 12.9)
	MCH [pg]	$10.2 \pm 0.61$ (8.0 – 11.0)
	MCHC [g/dl]	$35.6 \pm 1.56$ (26.0 – 42.0)
	MCV [fl]	$28.8 \pm 1.59$ (25.0 – 33.0)
Weisses Blutbild [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]	Gesamtleukozytenkonzentration	$7.7 \pm 1.36$ (4.5 – 13.2)
	Lymphozyten	$3.6 \pm 1.61$ (0.9 – 9.21)
	Neutrophile Granulozyten	$1.6 \pm 0.35$ (0.802 – 2.71)
	Eosinophile Granulozyten	$0.1 \pm 0.04$ (0.0 – 0.197)
	Basophile Granulozyten	$0.0 \pm 0.02$ (0.0 – 0.110)
	Monozyten	$0.8 \pm 0.54$ (0.013 – 2.37)

### 6.3.3. Serologische Untersuchung auf Border-Disease

#### 6.3.3.1. ELISA

Beim Schaf 1 trat zwischen den Tagen 49 und 56 eine Serokonversion auf. Das Schaf 2 wies am 70. Tag einen OD-Wert im verdächtigen Bereich auf (22.4 %; Abb. 24). Alle übrigen Schafe waren immer seronegativ (Abb. 24). Die OD-Werte reichten von -3.9 bis 43.4 ( $3.5 \pm 9.22$ ).



**Abb. 24:** Verlauf der OD-Werte bei 8 Schafen nach der Infektion mit BD-Virus. OD-Werte über 20 % wurden als verdächtig (horizontale grüne Linie), solche über 30 % als positiv (horizontale rote Linie) beurteilt.

#### 6.3.3.2. Serumneutralisationstest

Zwei Schafe (Nr. 1 und 2) hatten am 70. Tag nach der Infektion spezifische, neutralisierende Antikörper gegen das Border-Disease-Virus gebildet. Beim Schaf 1 wurde der genaue Titer bestimmt. Er lag bei 1:4120.

### **6.3.4. Virologische Untersuchungsergebnisse**

#### **6.3.4.1. Virusnachweis im Blut**

Bei vier Schafen (Nr. 1 bis 4) konnte zwischen dem 5. und 21. Tag nach der Infektion virale RNA aus dem Blut isoliert werden (Tab. 13). Die CT-Werte lagen zwischen 33.3 und 40.4 ( $36.8 \pm 1.68$ ). Der Nachweis gelang beim Schaf 4 am Tag 11 und beim Schaf 1 am Tag 21 nach der Infektion nur bei der Erstuntersuchung der Proben. Die übrigen viruspositiven Proben waren auch bei der nochmaligen Untersuchung der identischen Proben 7 bis 9 Wochen später positiv. Die Sequenzanalyse der viralen RNA in der 5'nt bei den Schafen 1 und 2 in den Blutproben der Tage 8 und 7 ergab eine komplette Übereinstimmung mit derjenigen des Infektionsvirus.

#### **6.3.4.2. Virusnachweis in Nasentupferproben**

In der Nasentupferprobe des Schafes 8 konnte am 10. Tag nach der Infektion virale RNA nachgewiesen werden (Tab. 13). Der CT-Wert lag bei 35.6. Bei der nochmaligen Untersuchung der gleichen Probe 9 Wochen später war der RNA-Nachweis negativ.

**Tab. 13:** Nachweis von viraler RNA aus EDTA-Blut und Nasentupfern von 8 Schafen nach der Infektion mit BD-Virus

Schaf	Material	Tage nach der Infektion													
		0	5	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	21
1	Blut														
	Tupfer														
2	Blut														
	Tupfer														
3	Blut														
	Tupfer														
4	Blut														
	Tupfer														
5	Blut														
	Tupfer														
6	Blut														
	Tupfer														
7	Blut														
	Tupfer														
8	Blut														
	Tupfer														

Blut = EDTA-Blut, Tupfer = Nasentupfer

Leere Felder: Kein Nachweis von viraler RNA

Hellgraue Felder: Nachweis von viraler RNA bei der Erstuntersuchung der Probe

Dunkelgraue Felder: Zweimaliger Nachweis von viraler RNA bei der Erst- und bei der nochmaligen Untersuchung der Probe 7 bis 9 Wochen (Blut) bzw. 9 Wochen (Tupfer) später

#### 6.3.4.3. Virusnachweis in Tupferproben von Schleimhautveränderungen

Die Tupferproben der Erosionen waren virusnegativ.

#### 6.4. Änderungen der Leukozyten- und Lymphozytenkonzentrationen während des Untersuchungszeitraums

Im Verlauf der Untersuchungen zeigten weder die Leukozyten- noch die Lymphozytenkonzentrationen signifikante Veränderungen ( $P$  jeweils  $> 0.05$ , generalisiertes lineares Modell).

## **7. Diskussion**

### **7.1. Übersicht**

Die vorliegende Arbeit beschreibt die erste Infektion von grossen Wiederkäuern mit dem Border-Disease-Virus durch gezielte Inokulation. Insbesondere im Hinblick auf Eradikations- und Kontrollprogramme von Pestivirus-induzierten Erkrankungen sind epidemiologische Untersuchungen bezüglich einer möglichen Interspeziesübertragung von grossem Interesse (CARLSSON und BELÁK, 1994; CAMPBELL et al., 1995). Da bisher wenig über das Vorkommen des Border-Disease-Virus bei Rindern bekannt ist, war das Ziel der Arbeit, die Empfänglichkeit grosser Wiederkäuer für das Border-Disease-Virus sowie die Übertragungsmöglichkeit des Virus vom kleinen auf den grossen Wiederkäuer zu untersuchen und ihre Auswirkungen zu beschreiben.

Der Beweis, dass das Border-Disease-Virus grosse Wiederkäuer erfolgreich infizieren kann, wurde bereits erbracht. KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. (2008b) und REICHLE (2009) hielten seronegative Kälber mit persistent mit BDV-infizierten Schafen zusammen. Alle Kälber serokonvertierten während der gemeinsamen Haltung. Zuvor wurde zweimalig von der Isolation des Border-Disease-Virus aus bovinem Untersuchungsmaterial berichtet (BECHER et al., 1997; CRANWELL et al., 2007). In beiden Fällen wurde aufgrund der klinisch identischen Krankheitsbilder die Verdachtsdiagnose der Bovinen Virusdiarrhoe gestellt. Im Rahmen von molekularbiologischen Untersuchungen konnte der Erreger der Border-Disease identifiziert werden.

### **7.2. Tiergruppe A (Kälber)**

#### **7.2.1. Virusnachweis**

Virale RNA wurde in Blutproben von 3 Kälbern (Nr. 1, 2 und 7) und in der Nasentupferprobe eines Kalbes (Nr. 4) nachgewiesen. Der Nachweis gelang jeweils einmalig. Alle virologischen Wiederholungsuntersuchungen der gleichen Blutpro-



ben einige Wochen später waren negativ. Der RNA-Nachweis kann durch zwei mögliche Ursachen bedingt sein:

1. Virämie (richtig positives Resultat der Erstuntersuchung)
2. Kontamination (falsch positives Resultat der Erstuntersuchung).

Die Anwesenheit viraler RNA in Blut- und Nasentupferproben bei der Erstuntersuchung kann mit einer tatsächlich stattgefundenen Infektion mit Virämie und konsekutiver Verteilung des Virus im Organismus erklärt werden (richtig positives Untersuchungsergebnis). Andererseits besteht die Möglichkeit einer viralen Kontamination (falsch positives Untersuchungsergebnis). Die Gefahr einer viralen Kontamination von Untersuchungsmaterial besteht sowohl bei der Probenentnahme im Stall als auch bei der Bearbeitung der Proben im Labor (VILČEK und BELÁK, 1996). Wenn zur gleichen Zeit nicht virämische und virusausscheidende Tiere vorhanden sind, wäre eine Kontamination sowohl im Stall als auch im Labor nicht mit Sicherheit zu verhindern. Aufgrund der hohen Sensitivität der real time (rt) RT-PCR-Untersuchung würden dabei auch geringste Mengen viraler RNA nachgewiesen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde auf möglichst sterile Entnahme der Proben, strikte räumliche Trennung der Tiergruppen sowie regelmässige Reinigung und Desinfektion von Händen und Stiefeln geachtet. Eine Kontamination im Stall kann deshalb mit grösster Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Kontaminationen während der Laborarbeit resultieren insbesondere aus einer ungenügenden räumlichen Trennung einzelner diagnostischer Schritte. Um dies zu vermeiden, sollten diagnostische Massnahmen und der experimentelle Umgang mit dem jeweiligen Virus an unterschiedlichen Orten stattfinden (VILČEK und BELÁK, 1996). Weiterhin kann ein „Verwischen“ viraler Partikel bei grossen Probenansätzen Kontaminationen bedingen. Im vorliegenden Fall wurden die Untersuchungen in speziell dafür vorgesehenen und räumlich getrennten Labors durchgeführt. Eine Kontamination während der Laborarbeit ist daher als unwahrscheinlich einzustufen.



Die äusserst sensitive Untersuchungsmethode mittels rt RT-PCR (WILLOUGHBY et al., 2006) ist dem Antigen-ELISA bezüglich ihrer Sensitivität um ein Vielfaches überlegen (GARCÍA-PÉREZ et al., 2009). Der Nachweis viraler RNA mittels rt RT-PCR ist deshalb als beweisend anzusehen. Die Möglichkeit eines „Übersehens“ viraler Partikel besteht praktisch nicht. Von falsch negativen Resultaten ist daher nicht auszugehen.

### **7.2.2. Serologie**

Die Ergebnisse der ELISA-Untersuchung waren negativ und ergaben demnach keine Hinweise auf eine erfolgreiche Infektion.

### **7.2.3. Serumneutralisationstest**

Am Infektionstag wurde bei 3 Kälbern (Nr. 1, 4 und 6) eine leichte Inhibition des BDV-Wachstums und bei drei weiteren Kälbern (Nr. 2, 4 und 7) eine ebenfalls schwache Wachstumshemmung des BVDV verzeichnet. Die gleichzeitige serologische Untersuchung der gleichen Proben mit dem ELISA ergab OD-Werte im negativen Bereich. Deshalb und aufgrund der Wachstumshemmung sowohl des Border-Disease-Virus als auch des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe bei gleicher Verdünnungsstufe, muss am ehesten von einer unspezifischen Inhibition ausgegangen werden. Der Untersuchungszeitpunkt am Tag der Infektion untermauert die Annahme, zumal die Blutprobenentnahme vor jeglichem Kontakt zu infektiösem Material stattgefunden hat.

Am Tag 70 nach der Infektion wurde das Wachstum des Border-Disease-Virus bei 2 Kälbern (Nr. 4 und 6) inhibiert. Beim Kalb 4 kann aufgrund einer, verglichen mit dem Infektionstag ähnlich starken Neutralisationspotenz, auf eine unspezifische Inhibition des BDV geschlossen werden. Beim Kalb 6 wurden das Border-Disease-Virus und das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe am Wachstum gehindert, wobei dies beim Border-Disease-Virus bis zu einer zwanzigfach höheren Verdünnungsstufe des Serums der Fall war. Dies zeigt, dass eine spezifische Inhibition

durch Antikörper vorlag. Die nachgewiesenen Antikörper waren gegen das Border-Disease-Virus und nicht gegen das BVDV gerichtet. Die geringe Neutralisationspotenz gegen das BVDV resultiert aus einer gewissen Kreuzneutralisation innerhalb des Genus Pestivirus. Induzierte, spezifische Antikörper neutralisieren das Border-Disease-Virus bis zu hundertfach besser als das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BECHER et al., 2003; REICHLE, 2009). Die höhere Neutralisationspotenz ist aus den Ergebnissen der Serumneutralisationstests der Tiergruppen B und C ersichtlich. Hier lagen die erforderlichen Serumverdünnungsstufen, die virales Wachstum zuließen, für das BDV stets um mindestens das Zehnfache höher als für das BVDV. Aus dem Serumneutralisationstest ist demnach ersichtlich, dass das Kalb 6 am Ende der Untersuchung neutralisierende Antikörper gegen das Border-Disease-Virus gebildet hatte. Letztlich ist der OD-Wert der ELISA-Untersuchung des gleichen Tages bemerkenswert. Er lag mit 9.3% deutlich höher als bei den anderen Kälbern.

Das Kalb 6 hatte im Anschluss an die Infektion nachweislich neutralisierende Antikörper gegen das Border-Disease-Virus gebildet. Dies kann als sicheres Zeichen einer erfolgreichen Infektion gewertet werden. Das Virus wurde zuvor zu keinem Zeitpunkt aus Blut- oder Nasentupferproben isoliert. Gegen das Ausbleiben einer Virämie spricht allerdings die serologische Reaktion. Viel eher muss in Betracht gezogen werden, dass eine möglicherweise stattgefundenen Virämie kürzer dauerte als das Intervall zwischen zwei Blutprobenentnahmen (kürzer als 24 Stunden). Über die Dauer einer möglichen Virämie bei Rindern nach Infektion mit dem Border-Disease-Virus existieren keine Untersuchungen. GARCÍA-PÉREZ et al. (2009) beschrieben nach artifizieller Infektion von Schafen eine Virämiedauer zwischen 1 und 10 Tagen. Allerdings ist auch von transienten Pestivirusinfektionen bekannt, dass die Virämie kaum nachweisbar ist (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008b). Dafür würde auch die schwache Antikörperreaktion bei diesem Kalb sprechen.

#### **7.2.4. Hämatologie**

Der Verlauf der Leukozyten- und Lymphozytenkonzentration zeigte keine signifikanten Veränderungen. Im Rahmen der Betrachtung der hämatologischen Untersuchungsergebnisse bestehen somit keine typischen Hinweise auf eine erfolgreich stattgefundene, virale Infektion. Die Begründung für ein nicht Zustandekommen einer Infektion kann in der Infektionsdosis und der gewählten Infektionsroute gesucht werden. Im Weiteren beeinflussen die Wirtsspezies im Zusammenhang mit der Infektionsfähigkeit des Virus das Infektionsgeschehen. Bei grossen Wiederkäuern wurde bisher kein Infektionsversuch mit dem Border-Disease-Virus durch Inokulation beschrieben. Aufgrund der Verwendung anderer Pestiviren gestaltet es sich deshalb schwierig, Vergleiche mit bereits bestehenden Studien anzustellen. Auch ein direkter Vergleich unterschiedlicher Infektionsdosen und Infektionsrouten wird dadurch erschwert. Diesbezüglich ist aber festzuhalten, dass für das BVD-Virus bei Kälbern gezeigt wurde, dass die Virusausbreitung im Organismus und die Manifestation klinischer Symptome von der Infektionsdosis sowie der Virulenz des Erregers abhängen (BOLIN und RIDPATH, 1992). SAWYER (1992) führte Unterschiede in der Pathogenität von BDV-Stämmen sowie unterschiedliche Infektionsdosen und -routen als Ursache für die Variabilität der Manifestation klinischer Symptome an. Die in dieser Arbeit gewählte Infektionsdosis und die oronasale Infektionsroute haben sich bei der experimentellen Infektion grosser Wiederkäuer mit dem BVD-Virus bewährt (ARQUINT, 2003; RIDPATH et al., 2007). Es ist aber durchaus möglich, dass dies für die Infektion von Rindern mit Border-Disease-Virus nicht zutrifft.

#### **7.2.5. Klinik**

Die Kälber 4 bis 7 wiesen am Tag 2 nach der Infektion eine reduzierte Fresslust auf. Es ist möglich, dass dies mit der Infektion zusammenhing, da die Fresslust während der Akklimatisationsphase nie gestört war.

Fünf Kälber (Nr. 1, 2 und 5 bis 7) zeigten nach der Infektion Erosionen der Maulschleimhaut. Da die Veränderungen erst im Anschluss an die Infektion auftraten, ist zu vermuten, dass sie durch das Infektionsvirus verursacht wurden. Sie sind wahrscheinlich als Folge einer Virusreplikation in Epithelien der Maulschleimhaut zustande gekommen (BROWNLIE, 1991). Alternativ muss in Betracht gezogen werden, dass sie durch eine allergische Reaktion bzw. eine direkte Schädigung durch einen nicht infektiösen Bestandteil der Virussuspension bewirkt wurden. Da diese aber primär aus Zellkulturmedium bestand, welches für die in-vitro-Kultur boviner Epithelzellen verwendet wird, ist eine direkte Zellschädigung eher unwahrscheinlich. In ähnlichen Infektionsversuchen mit Virussuspension wurden keine solchen Veränderungen beobachtet (ARQUINT, 2003). Auch die Ergebnisse von REICHLE (2009) sprechen gegen eine schleimhautschädigende Wirkung der Virussuspension, da von der genannten Autorin nach natürlichen Border-Disease-Infektionen ähnliche Veränderungen der Maulschleimhaut beobachtet wurden, ohne dass eine Virussuspension verwendet wurde.

Die Alterationen traten auch bei Kälbern auf, bei denen keine virale RNA im Blut nachgewiesen wurde. Eine Erklärung dafür könnte im zeitlich zu breiten Probenentnahmeintervall liegen. Eine andere Erklärung könnte darin liegen, dass sich die Virusreplikation lokal auf die Maulschleimhaut begrenzte. Gegen eine auf den Maulbereich begrenzte Infektion spricht der fehlende Virusnachweis in Tupferproben von Erosionen.

### **7.3. Tiergruppe B (Ziegen)**

#### **7.3.1. Virusnachweis**

Die Blutproben von 4 Ziegen (Nr. 1, 4, 6 und 7) waren an mehreren Tagen in der RT-PCR-Untersuchung positiv. Bei zwei Ziegen (Nr. 5 und 6) wurde pestivirale RNA jeweils an einem Tag aus Nasentupferproben isoliert. Bei der Ziege 5 konnte im Blut nie Virus nachgewiesen werden, während die Ziege 6 vor dem positiven Nasentupfer mehrmals als virämisch getestet wurde. Am Tag der positiven Nasen-

tupferprobe konnte das Virus allerdings ebenfalls nicht im Blut nachgewiesen werden.

BOLIN und RIDPATH (1992) beschrieben unterschiedliche Virulenzen zweier BVDV-Isolate. Sie stellten nach experimenteller Infektion von Kälbern mit zwei unterschiedlichen BVD-Virusstämmen unterschiedlich hohe Virustiter im Blut fest. Bei Annahme einer Analogie für das Border-Disease-Virus ist die Frage zu stellen ob im Falle des Nichtnachweises einer Virämie die Virusmenge im Blut im vorliegenden Fall zur Detektion nicht ausgereicht hat.

### **7.3.2. Serologie**

Mittels ELISA konnte eine Serokonversion bei 3 der 4 positiven Ziegen nachgewiesen werden (Nr. 1, 4 und 7). Eine weitere Ziege wies am 70. Tag nach der Infektion OD-Werte im verdächtigen Bereich auf (Nr. 6). Aus der Untersuchung geht hervor, dass alle Ziegen, bei denen zuvor virale RNA im Blut nachgewiesen wurde, eine serologische Reaktion zeigten.

### **7.3.3. Serumneutralisationstest**

Im Serumneutralisationstest wurden auch bei der Ziege 6 neutralisierende Antikörper gefunden. Somit konnte für die Ziegen, die positiv auf das Vorhandensein viraler RNA im Blut getestet wurden, eine Induktion spezifischer Antikörper gegen das BD-Virus nachgewiesen werden. Eine erfolgreiche Infektion konnte somit für die vier Ziegen bestätigt werden. Das Ergebnis zeigt auch, dass der Serumneutralisationstest dem AK-ELISA bezüglich seiner Sensitivität deutlich überlegen ist. Der AK-ELISA wies zum Ende der Untersuchungen Antikörpertiter im verdächtigen Bereich aus. Ersichtlich wird die Feststellung auch im Vergleich des AK-ELISA's mit dem Serumneutralisationstest bei Kalb 6 am 70. Tag nach der Infektion.

#### **7.3.4. Hämatologie**

Die Leukozyten- und Lymphozytenverlaufskurven wiesen im Anschluss an die Infektion bei den Ziegen keine signifikanten Veränderungen auf. Solche Veränderungen der Leukozyten- und Lymphozytenkonzentrationen können ausbleiben, wenn eine erfolgreiche Infektion zu keinem Zeitpunkt stattgefunden hat. Dagegen spricht der Nachweis einer Virämie mit konsekutiver Serokonversion bei einem Teil der Tiere. Andererseits wurde beschrieben, dass es, in Abhängigkeit von der Virulenz von BVDV, zu einer Variabilität in der Manifestation klinischer und hämatologischer Symptome kommt (BOLIN und RIDPATH, 1992; RIDPATH et al., 2007). So ist es möglich, dass das Infektionsvirus in der vorliegenden Arbeit eine zu geringe Virulenz aufwies, um signifikante Veränderungen im Sinne einer manifesten Leukopenie auslösen zu können. Da es sich in der vorliegenden Arbeit um den ersten Infektionsversuch mit dem CH-BD4-Virus handelt, liegen bisher keine Erkenntnisse bezüglich seines Infektionsverhaltens vor.

#### **7.3.5. Klinik**

Die erosiven Veränderungen am dorsalen Vulvawinkel zweier Ziegen (Nr. 6 und 7) standen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit mit der Infektion in Verbindung. Beide Ziegen waren virämisch und bildeten neutralisierende Antikörper. Die erosiven Veränderungen decken sich nicht mit den Befunden bisheriger Pestivirusinfektionsversuche bei immunkompetenten kleinen Wiederkäuern, bei denen keine klinischen Symptome nach experimenteller Infektion aufgetreten waren (LØKEN und BJERKÅS, 1991; GARCÍA-PÉREZ et al., 2009).

### **7.4. Tiergruppe C (Schafe)**

#### **7.4.1. Virusnachweis**

Bei 4 Schafen (Nr. 1 bis 4) konnte virale RNA im Blut nachgewiesen werden. Bei den Schafen 1 und 2 war dies an mehreren Tagen, bei den Schafen 3 und 4 nur an einem Tag möglich. Mit Ausnahme des Schafes 4 war der Nachweis viraler RNA

auch in Wiederholungsuntersuchungen positiv. Beim Schaf 8 wurde pestivirale RNA jeweils an einem Tag aus Nasentupferproben isoliert. RNA konnte zuvor im Blut nie nachgewiesen werden. Durch Sequenzierung zweier Virusisolate der Schafe 1 und 2 konnte gezeigt werden, dass das nachgewiesene Virus mit dem Infektionsvirus übereinstimmte. Die übrigen Schafe, bei denen virale RNA zu keinem Zeitpunkt der Untersuchungen nachgewiesen wurde (Nr. 5 bis 8), zeigten auch keine serologischen Reaktionen aber teilweise klinische Symptome (Nr. 6 bis 8). Die Befunde können wie unter 7.4.2. diskutiert werden.

#### **7.4.2. Serologie**

Eines von zwei Schafen, bei denen die Virämie länger als einen Tag bestanden hatte, zeigte eine Serokonversion (Nr. 1); das andere war am 70. Tag antikörperverdächtig (Nr. 2). Die beiden Schafe, die nur an einem Tag positiv waren, blieben bis zum Versuchsende seronegativ (Nr. 3 und 4).

Die fehlende Serokonversion kann, analog wie von BOLIN und RIDPATH (1992) für unterschiedliche serologische Reaktionen in Abhängigkeit von der Virulenz von BVDV beschrieben, mit einer zu geringen Virulenz des verwendeten BD-Virus erklärt werden. BROWNLIE (1990) beschrieb, ebenfalls für akute BVDV-Infektionen immunkompetenter Tiere, eine langsame Antikörperreaktion über 10 bis 12 Wochen nach der Infektion. So besteht die Möglichkeit, dass bei den Schafen, die klinische Symptome ohne eine serologische Reaktion aufwiesen, die Zeitspanne von 70 Tagen für eine nachweisbare Antikörperreaktion nicht ausreicht hat.

#### **7.4.3. Serumneutralisationstest**

Der Antikörpernachweis im Serumneutralisationstest bei den Schafen 1 und 2 belegt, dass die induzierten Antikörper spezifisch, also gegen das BD-Virus gerichtet waren. Die Überlegenheit bezüglich der Sensitivität des SNT's im Gegensatz zum

AK-ELISA wird dadurch deutlich, dass auch beim Schaf 2 neutralisierende Antikörper nachgewiesen wurden.

#### **7.4.4. Hämatologie**

Die Leukozyten- und Lymphozytenverlaufskurven wiesen bei den Schafen im Anschluss an die Infektion keine signifikanten Veränderungen auf. Dabei kann auf gleiche Weise wie unter 7.3.4. argumentiert werden. Die ausbleibenden hämatologischen Veränderungen können auch mit der Tatsache begründet werden, dass bei immunkompetenten Tieren transiente Infektionen mit Pestiviren ohne hämatologische Symptome verlaufen können (GUNN, 1993).

#### **7.4.5. Klinik**

Die Veränderungen der Vulva und ihrer Umgebung bei 6 Schafen (Nr. 2 bis 4 und 6 bis 8) können aufgrund des ähnlichen Erscheinungsbildes zu denen der Ziegen und des zeitlichen Auftretens nach der Infektion ebenfalls mit dem Virus in Verbindung gebracht werden. Bei den Schafen waren die Vulvaveränderungen stärker ausgeprägt und hatten länger Bestand als bei den Ziegen. Eine Virämie wurde nur bei drei der sechs Schafe nachgewiesen. Die Veränderungen am Maul bei 4 Schafen (Nr. 4 bis 6 und 8) traten mit Ausnahme von Schaf 4 ebenfalls ohne eine nachweisbare Virämie auf. Die Diskrepanz zwischen Virusnachweis und Klinik wurde bereits diskutiert (7.2.3.).

#### **7.5. Tiergruppenvergleich**

Die individuellen Reaktionsmuster und die unterschiedlichen Reaktionen der einzelnen Tiergruppen auf die Infektion mit dem BD-Virus können vielfältig begründet werden. Mit Blick auf das Border-Disease-Virus liegt beim direkten Vergleich der verschiedenen Tiergruppen die Vermutung nahe, dass die Auswirkungen einer Infektion beim Kalb deshalb wesentlich geringer sind als beim kleinen Wiederkäuer, da es sich bei den grossen Wiederkäuern nicht um die natürliche Wirtsspe-



zies handelt. Da auch über Unterschiede in der Manifestation pathologischer Symptome zwischen Schafen und Ziegen berichtet wurde (LØKEN und BJERKÅS, 1991), sind die Unterschiede zwischen Schafen und Ziegen vermutlich ähnlich zu erklären. Eine unterschiedliche Virulenz des Virus als Ursache für unterschiedliche Reaktionen der Tiergruppen kann aufgrund der Verwendung des gleichen Infektionsvirus für alle Tiere ausgeschlossen werden. Wohl aber kann eine Schwächung der Infektiosität oder der Virulenz des Infektionsvirus im Rahmen der Kultivierung bei gleichzeitigem Vorliegen unterschiedlicher, individueller Konstitutionen (ORZECHOWSKA et al., 2003) für das Zustandekommen der Infektion bei einem Teil der Tiere und das nicht Zustandekommen bei dem anderen Teil der Tiere verantwortlich gemacht werden. Bei in-vitro kultivierten Viren besteht die Möglichkeit eines Infektiositätsverlustes. An Zellkulturen adaptierte Viren sind für ihre natürlichen Wirte typischerweise weniger infektiös als native Isolate (NUTTAL et al., 1980). Die Folge kann eine Abnahme der Replikationsfähigkeit und -häufigkeit in-vivo sein, was unterschiedliche Reaktionsmuster im Anschluss an eine Infektion bedingen kann (BOLIN und RIDPATH, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde die vierte Passage des Virus zur Infektion verwendet. Im Rahmen der Infektion sind Viren teilweise in der Lage, die Immunantwort des Wirtsorganismus zu beeinträchtigen. Auf diese Weise kann es zu verlängerten Virämiephasen oder einer verspäteten Antikörperbildung kommen (BOLIN und RIDPATH, 1992). Die vorliegenden Resultate zeigen, dass manche Tiere mit einer „normalen“, starken Immunreaktion reagiert haben, während andere überhaupt keine Antikörper gebildet haben. Aus dieser „Alles-oder-Nichts“-Situation lässt sich schliessen, dass die Ursache wahrscheinlich weniger beim Virus als bei der Infektion an sich zu suchen ist. Als beeinflussende Parameter können insbesondere die Infektionsdosis und der Infektionsweg betrachtet werden. Im Hinblick auf die Arbeit von REICHLE (2009) kann auch die Infektionsfrequenz als Einflussfaktor auf den Erfolg einer experimentellen Infektion angeführt werden. Die Arbeit beschrieb das Infektionsgeschehen bei gemeinsamer Haltung von seronegativen

Kälbern mit persistent mit BDV-infizierten Schafen. Ein Grossteil der Kälber hatte nach einiger Zeit Antikörper gegen das Border-Disease-Virus gebildet. REICHLE (2009) beschrieb auch Veränderungen der Maulschleimhaut, die denen der vorliegenden Arbeit sehr ähnlich waren.

Das Alter der Tiere dürfte keinen Einfluss auf das Infektionsgeschehen haben. Einerseits ist bekannt, dass das Alter auf die Ausprägung von Symptomen akuter Feldinfektionen mit anderen Pestiviren keine Rolle spielt (BOLIN und RIDPATH, 1992). Andererseits sind im vorliegenden Fall alle Tiere einer jeden Gruppe immunologisch gleichalt, so dass aufgrund des Alters keine Erklärung für Reaktionsunterschiede auf die Infektion gegeben werden kann. Immunologisch gleichalt bedeutet im vorliegenden Fall das altersabhängige Vorliegen einer belastbaren Immunkompetenz und das Fehlen maternalen Antikörper.

Schliesslich können interindividuelle Unterschiede der Konstitution und Genetik individuelle Reaktionslagen der unspezifischen, antiviralen Immunität bedingen was in Unterschieden der Manifestation von Symptomen im Anschluss an eine Infektion resultiert (ORZECZOWSKA et al., 2003).

## **7.6. Schlussfolgerungen**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Kälber, Schafe und Ziegen experimentell mit dem Border-Disease-Virus zu infizieren, um klinische, virologische, serologische und hämatologische Auswirkungen einer akuten Infektion bei den verschiedenen Tierarten zu beschreiben. Grosses Interesse bestand insbesondere, weil bis anhin ein derartiger Infektionsversuch bei grossen Wiederkäuern nicht unternommen wurde. Dementsprechend lagen keine Erkenntnisse bezüglich der untersuchten Parameter beim Rind vor. Ausserdem ist nicht bekannt, ob grosse Wiederkäuer nach intrauteriner Infektion persistent mit dem Border-Disease-Virus infizierte Nachkommen hervorbringen können. Aufgrund der daraus möglicherweise resultierenden, nicht zu vernachlässigenden, epidemiologischen Konsequenz, insbe-

sondere im Hinblick auf Kontrollprogramme von pestivirusbedingten Erkrankungen, sind die Ergebnisse von grosser Relevanz.

Im Hinblick auf das laufende Eradikationsprogramm der Bovinen-Virusdiarrhoe beim Rind können persistente Border-Disease-Virus-Infektionen kleiner Wiederkäuer von grosser Bedeutung sein. Hat das Eradikationsprogramm Erfolg, wird beim Rind eine Seroprävalenz für das BVDV von 0 % und damit eine volle Empfänglichkeit gegenüber Pestivirusinfektionen vorliegen (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008b). Im gleichen Sinne wurde die epidemiologische Bedeutung von persistent mit BVDV infizierten, kleinen Wiederkäuern angeführt (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008a). Folglich bleibt zu diskutieren, ob über längere Zeit unerkannte, persistente Virusausscheider eine Wiedereinführung der Infektion in BVDV-freie Rinderherden bedingen oder gar eine erfolgreiche Eradikation in bestimmten Regionen gefährden können. Dies ist insbesondere bei gemeinsamen Haltungsformen grosser und kleiner Wiederkäuer zu beachten, wobei die Alpbewirtschaftung die grösste Herausforderung darstellt (CARLSSON und BELÁK, 1994; CAMPBELL et al., 1995). Durch den Nachweis des Border-Disease-Virus aus bovinem Untersuchungsmaterial (BECHER et al., 1997; CRANWELL et al., 2007) und durch die vorliegende Arbeit findet die epidemiologische Auseinandersetzung diesbezüglich ihre Berechtigung.

Die vorliegende Arbeit gibt erste Hinweise auf eine mögliche, experimentelle Infektion grosser Wiederkäuer mit dem Border-Disease-Virus. Aufgrund der teilweise ausbleibenden serologischen Reaktion kann eine erfolgreich stattgefunden Infektion nicht für alle Tiere zweifelsfrei bestätigt werden. Die möglichen Ursachen wurden diskutiert. Angeführte Diskussionspunkte sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Hierbei wäre insbesondere die Modulation des Infektionsvirus, der Infektionsdosis sowie des Infektionsweges von besonderem Interesse.

## 8. Literaturverzeichnis

ADLER, H., B. FRECH, P. MEIER, T. W. JUNGI and E. PETERHANS (1994): Noncytopathic strains of bovine viral diarrhea virus prime bovine bone marrow-derived macrophages for enhanced generation of nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 202, 1562-1568.

ANDERSON, C. A., R. J. HIGGINS, M. E. SMITH and B. I. OSBURN (1987a): Border disease. Virus-induced decrease in thyroid hormone levels with associated hypomyelination. *Lab. Invest.* 57, 168-175.

ANDERSON, C. A., M. SAWYER, R. J. HIGGINS, N. EAST and B. I. OSBURN (1987b): Experimentally induced ovine border disease: extensive hypomyelination with minimal viral antigen in neonatal spinal cord. *Am. J. Vet. Res.* 48, 499-503.

ANDERSON, D. E., D. M. RINGS and D. G. PUGH (2002): Hairy shaker disease of lambs. In: *Sheep and Goat Medicine*, Ed. D. G. Pugh. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 219.

ARQUINT, A. (2003): Immunhistologische Untersuchungen an Hautbiopsien bei akuter BVD (Bovine Virus Diarrhoe). Dissertation, Universität Zürich.

BACHOFEN, C., H. STALDER, U. BRAUN, M. HILBE, F. EHRENSPERGER and E. PETERHANS (2008): Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Vet. Microbiol.* 131, 93-102.

BARLOW, R. M., J. T. VANTSIS, A. C. GARDINER, J. C. RENNIE, J. A. HERRING, F. M. M. SCOTT (1980): Mechanisms of natural transmission of Border Disease. *J. Comp. Pathol.* 90, 57-65.

BECHER, P., M. ORLICH, A. D. SHANNON, G. HORNER, M. KÖNIG and H. J. THIEL (1997): Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* 78, 1357-1366.

BECHER, P., R. A. RAMIREZ, M. ORLICH, S. C. ROSALES, M. KÖNIG, M. SCHWEIZER, H. P. STALDER, H. SCHIRRMIEIER and H. J. THIEL (2003): Genetic and antigenetic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311, 96-104.

BOLIN, S. R. and J. F. RIDPATH (1992): Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.* 53, 2157-2163.

BONNIWELL, M. A., P. F. NETTLETON, A. C. GARDINER, R. M. BARLOW and J. S. GILMOUR (1987): Border disease without nervous signs or fleece changes. *Vet. Rec.* 120, 246-249.

BOSTEDT, H. und K. DEDIÉ (1996): Border-Krankheit. In: Schaf- und Ziegenkrankheiten, Hrsg. H. Bostedt und K. Dedié. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 487-491.

BRAUN, U., M. HILBE, F. EHRENSPERGER, F. SALIS, P. ALTHER, M. STRASSER, H. P. STALDER und E. PETERHANS (2002): Border Disease in einem Schafbetrieb. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 144, 419-426.

BRAUN, U., F. SALIS und M. HILBE (2004): Kontaktinfektion von Lämmern bei gemeinsamer Haltung mit einem persistent mit Border-Disease-Virus infizierten Lamm. *Tierärztl. Umschau* 59, 371-373.

BROADDUS, C. C., G. R. HOLYOAK, L. DAWSON, D. L. STEP, R. A. FUNK and S. KAPIL (2007): Transmission of bovine viral diarrhea virus to adult goats from persistently infected cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 545-548.

BROWNLIE, J. (1990): The pathogenesis of bovine virus diarrhea virus infections. *Rev.-Off. Int. Epizoot.* 9, 43-59.

BROWNLIE, J. (1991): The pathways for bovine virus diarrhea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch. Virol.* [Suppl. 3], 79-96.

CAFFREY, J. F., A. M. DUDGEON, W. J. DONNELLY, B. J. SHEAHAN and G. J. ATKINS (1997): Morphometric analysis of growth retardation in fetal lambs following experimental infection of pregnant ewes with border disease virus. *Res. Vet. Sci.* 62, 245-248.

CAMPBELL, J. R., O. M. RADOSTITS, J. T. WOLFE and E. D. JANZEN (1995): An outbreak of border disease in a sheep flock. *Can. Vet. J.* 36, 307-309.

CARLSSON, U. (1991): Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 128, 145-147.

CARLSSON, U. and K. BELÁK (1994): Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. *Acta Vet. Scand.* 35, 79-88.

CARTER, H. B., S. TERLECKI and I. G. SHAW (1972): Experimental border disease of sheep: effect of infection on primary follicle differentiation in the skin of Dorset horn lambs. *Br. Vet. J.* 128, 421-427.

CEBRA, C. and M. CEBRA (2002): Border disease virus. In: *Sheep and Goat Medicine*, Ed. D. G. Pugh. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 389-391.

CHAPPUIS, G., A. BRUN, F. KATO, M. DAUVERGNE, G. REYNAUD et C. DURET (1986): Études sérologiques et immunologiques réalisées à la suite de l'isolement d'un pestivirus dans un foyer ovin chez des moutons de L'Aveyron. In: *Pestiviroses des ovins et des bovins: nouvelles connaissances et utilisation pour une stratégie de contrôle*, Ed. J. Espinasse et M. Savey. Société Française de Buiatrie, Paris, 55-66.

COLLETT, M. S., R. LARSON, S. K. BELZER and E. RETZEL (1988): Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* 165, 200-208.

CRANWELL, M. P., A. OTTER, J. ERRINGTON, R. A. HOGG, P. WAKELEY and T. SANDVIK (2007): Detection of border disease virus in cattle. *Vet. Rec.* 161, 211-212.

DUBOIS, E., P. RUSSO, M. PRIGENT and R. THIÉRY (2008): Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Vet. Microbiol.* 130, 69-79.

FROST, J. W., I. WESTPHÄLING und H. KRAUSS (1991): Seroepidemiologische Untersuchungen bei Schafen in Süd- und Mittelhessen zur Verbreitung von Antikörpern gegen Border-Disease/BVD-Virus. *Tierärztl. Umschau* 42, 533-536.

GARCÍA-PÉREZ, A. L., E. MINGUIJÓN, L. ESTÉVEZ, J. F. BARANDIKA, G. ADURIZ, R. A. JUSTE and A. HURTADO (2009): Clinical and laboratorial findings in pregnant ewes and their progeny infected with Border disease virus (BDV-4 genotype). *Res. Vet. Sci.* 86, 345-352.

GARDINER, A. C., P. F. NETTLETON and R. M. BARLOW (1983): Virology and immunology of a spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical border disease. *J. Comp. Pathol.* 93, 463-469.

GRAHAM, D. A., V. CALVERT, A. GERMAN and S. J. McCULLOUGH (2001): Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 148, 69-72.

GUNN, H. M. (1993): Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 132, 584-585.

HOUE, H. (1995): Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clin. North Am. (Food Anim. Pract.)* 11, 521-547.

HUGHES, L. E., G. F. KERSHAW and I. G. SHAW (1959): "B" or border disease. An undescribed disease of sheep. *Vet. Rec.* 71, 313-317.

KIM, I. J., B. H. HYUN, J. H. SHIN, K. K. LEE, K. W. LEE, K. O. CHO and M. I. KANG (2006): Identification of bovine viral diarrhea virus type 2 in Korean native goat (*Capra hircus*). *Virus Res.* 121, 103-106.

KÖNIG, M., S. CEDILLO ROSALES, P. BECHER and H. J. THIEL (2003): Heterogenität ruminanter Pestiviren: Akademisches Interesse oder wichtige Grundlage für die Entwicklung von Impfstoffen und Diagnostika? *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 116, 216-221.

KRAMETTER, R., S. S. NIELSEN, A. LOITSCH, W. FRÖTSCHER, V. BENETKA, K. MÖSTL and W. BAUMGARTNER (2004): Pestivirus exposure in free-living and captive deer in Austria. *J. Wildl. Dis.* 40, 791-795.

KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., H. KOHLER, V. BENETKA, K. MÖSTL, F. GOLJA, S. VILČEK and W. BAUMGARTNER (2007a): Influence of communal alpine pasturing on the spread of pestivirus among sheep and goats in Austria: first identification of border disease virus in Austria. *Zoonoses Public Health* 54, 209-213.

KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., A. LOITSCH, H. KOHLER, A. SCHLEINER, P. SCHIEFER, K. MÖSTL, F. GOLJA and W. BAUMGARTNER (2007b): Serological survey for antibodies against pestiviruses in sheep in Austria. *Vet. Rec.* 160, 726-730.

KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., V. BENETKA, M. DUENSER, Z. BAGÓ, A. THEINER, B. PREYLER, K. MÖSTL, S. VILČEK and W. BAUMGARTNER (2008a): Descriptive study of a pestivirus infection in an Austrian goat. *Vet. Rec.* 163, 192-194.

KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., V. BENETKA, K. MÖSTL and W. BAUMGARTNER (2008b): Transmission of Border Disease Virus from sheep to calves – a possible risk factor for the Austrian BVD eradication programme in cattle? *Wien. Tierärztl. Mschr.* 95, 200-203.

LILLEHAUG, A., T. VIKØREN, I. L. LARSEN, J. ÅKERSTEDT, J. THARALDSEN and K. HANDELAND (2003): Antibodies to alpha-herpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervids. *J. Wildl. Dis.* 39, 779-786.

LØKEN, T. (1987): Experimentally-induced border disease in goats. *J. Comp. Pathol.* 97, 85-89.

LØKEN, T., I. BJERKÅS and H. J. LARSEN (1990): Experimental pestivirus infections in newborn goat kids. *J. Comp. Pathol.* 103, 277-288.

LØKEN, T. and I. BJERKÅS (1991): Experimental pestivirus infections in pregnant goats. *J. Comp. Pathol.* 105, 123-140.

LØKEN, T., J. KROGSRUD and I. BJERKÅS (1991): Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J. Comp. Pathol.* 104, 195-209.

LØKEN, T. (1995): Ruminant pestivirus infections in animals other than cattle and sheep. *Vet. Clin. North Am. (Food Anim. Pract.)* 11, 597-614.

MARCO, I., J. R. LOPEZ-OLVERA, R. ROSELL, E. VIDAL, A. HURTADO, R. JUSTE, M. PUMAROLA and S. LAVIN (2007): Severe outbreak of disease in the southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) associated with border disease virus infection. *Vet. Microbiol.* 120, 33-41.

McGOWAN, M. R., P. D. KIRKLAND, S. G. RICHARDS and I. R. LITTLEJOHNS (1993): Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet. Rec.* 133, 39-43.

MOBINI, S., A. M. HEATH and D. G. PUGH (2002): Border disease. In: *Sheep and Goat Medicine*, Ed. D. G. Pugh. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 177.

MONIES, R. J. and V. R. SIMPSON (1997): Syndrome in sheep resembling mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 141, 451.

NETTLETON, P. F. (1990): Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev. Sci.Tech.* 9, 131-150.



NETTLETON, P. F., J. S. GILMOUR, J. A. HERRING and J. A. SINCLAIR (1992): The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 179-188.

NETTLETON, P. F. and G. ENTRICAN (1995): Ruminant pestiviruses. *Br. Vet. J.* 151, 615-642.

NETTLETON, P. F., J. A. GILRAY, P. RUSSO and E. DLISSI (1998): Border disease of sheep and goats. *Vet. Res.* 29, 327-340.

NETTLETON, P. F. and K. WILLOUGHBY (2007): Border disease. In: *Diseases of Sheep*, Ed. I. D. Aitken. Blackwell Science, Oxford, 119-126.

NIELSEN, S. S., L. ROENSHOLT and V. BITSCH (2000): Bovine virus diarrhea virus in free-living deer from Denmark. *J. Wildl. Dis.* 36, 584-587.

NUTTAL, P. A., E. J. STOTT and L. H. THOMAS (1980): Experimental infection of calves with two strains of bovine virus diarrhoea virus: virus recovery and clinical reactions. *Res. Vet. Sci.* 28, 91-95.

OLDE RIEKERINK, R. G. M., A. DOMINICI, H. W. BARKEMA and A. J. DE SMIT (2005): Seroprevalence of pestivirus in four species of alpine wild ungulates in the High Valley of Susa, Italy. *Vet. Microbiol.* 108, 297-303.

ORZECZOWSKA, B., Z. ANTOSZKÓW and Z. BLACH-OLSZEWSKA (2003): Individual differentiation of innate antiviral immunity in humans; the role of endogenous interferons and tumor necrosis factor in the immunity of leukocytes. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 51, 51-60.

PATON, D. J. (1995): Pestivirus diversity. *J. Comp. Pathol.* 112, 215-236.

PATON, D., M. GUNN, J. SANDS, F. YAPP, T. DREW, S. VILČEK and S. EDWARDS (1997): Establishment of serial persistent infections with bovine viral diarrhoea virus in cattle and sheep and changes in epitope expression related to host species. *Arch. Virol.* 142, 929-938.

POTTS, B. J., L. J. BERRY, B. I. OSBURN and K. P. JOHNSON (1985): Viral persistence and abnormalities of the central nervous system after congenital infection of sheep with border disease virus. *J. Infect. Dis.* 151, 337-343.

REED, L. J. and H. MÜNCH (1938): A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497.

REICHLE, S. F. (2009): Untersuchungen bei Kälbern, die mit Border-Disease infizierten Lämmern zusammengehalten werden. Dissertation, Universität Zürich.

RICHARDSON, C., C. N. HEBERT and J. T. DONE (1976): Experimental border disease in sheep: dose-response effect. *Br. Vet. J.* 132, 202-208.

RIDPATH, J. F., J. D. NEILL and E. PETERHANS (2007): Impact of variation in acute virulence of BVDV1 strains on design of better vaccine efficacy challenge models. *Vaccine* 25, 8058-8066.

SANDS, J. J. and J. W. HARKNESS (1978): The distribution of antibodies to border disease virus among sheep in England and Wales. *Res. Vet. Sci.* 25, 241-242.

SAWYER, M. M., C. E. SCHORE, P. I. MENZIES and B. I. OSBURN (1986): Border disease in a flock of sheep: epidemiologic, laboratory, and clinical findings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189, 61-65.

SAWYER, M. M. (1992): Border disease of sheep: The disease in the newborn, adolescent and adult. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 171-177.

SCHALLER, P., H. R. VOGT, M. STRASSER, P. F. NETTLETON, E. PETERHANS and R. ZANONI (2000): Seroprevalence of maedi-visna and border disease in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 142, 145-153.

SCHLEINER, A., R. KRAMETTER-FRÖTSCHER, P. SCHIEFER, A. LOITSCH, F. GOLJA, K. MÖSTL und W. BAUMGARTNER (2006): Seroepidemiologische Untersuchung bei Schafen in Kärnten zur Verbreitung von ruminanten Pestiviren. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 119, 203-208.

SCHÖNMANN, M. (1997): Epidemiologische Untersuchungen über die Verbreitung der BVD-Virusinfektion auf schweizerischen Rinderalpen. Dissertation, Universität Zürich.

STALDER, H. P., P. MEIER, G. PFAFFEN, C. WAGECK-CANAL, J. RÜFENACHT, P. SCHALLER, C. BACHOFEN, S. MARTI, H. R. VOGT and E. PETERHANS (2005): Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 72, 37-41.

STALDER, H. P. (2008): Phylogenetischer Baum der Pestiviren, basierend auf der für das Virusprotein N<sup>pro</sup>-kodierenden Sequenz. In: Poster 3.16, 7. Pestivirus-Symposium, Uppsala, Schweden.

TERPSTRA, C. (1981): Border disease: virus persistence, antibody response and transmission studies. *Res. Vet. Sci.* 30, 185-191.

TERPSTRA, C. and G. WENSVOORT (1988): The protective value of vaccine-induced neutralising antibody titres in swine fever. *Vet. Microbiol.* 16, 123-128.

THABTI, F., L. FRONZAROLI, E. DLISSI, J. M. GUIBERT, S. HAMMAMI, M. PEPIN and P. RUSSO (2002): Experimental model of border disease virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet. Res.* 33, 35-45.

THÜR, B., M. HILBE, M. STRASSER and F. EHRENSPERGER (1997): Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am. J. Vet. Res.* 58, 1371-1375.

TSCHUOR, A. C., B. RIOND, U. BRAUN und H. LUTZ (2008): Hämatologische und klinisch-chemische Referenzwerte für adulte Ziegen und Schafe. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 150, 287-295.

VILČEK, S., A. J. HERRING, J. A. HERRING, P. F. NETTLETON, J. P. LOWINGS and D. J. PATON (1994): Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136, 309-323.

VILČEK, S. and S. BELÁK (1996): Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J. Virol. Methods* 60, 103-108.

VILČEK, S., P. F. NETTLETON, D. J. PATON and S. BELÁK (1997): Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.* 78, 725-735.

WEISS, M., C. HERTIG, M. STRASSEN, H. R. VOGT und E. PETERHANS (1994): Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease: eine Übersicht. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 136, 173-185.

WILLOUGHBY, K., B. VALDAZO-GONZÁLEZ, M. MALEY, J. GILRAY and P. F. NETTLETON (2006): Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *J. Virol. Methods* 132, 187-194.

WINKLER, C. E., D. F. GIBBONS and I. G. SHAW (1975): Observations on the experimental transmissibility of border disease in sheep. *Br. Vet. J.* 131, 32-39.

## 9. Lebenslauf

Christof Reichert

17.10.1982	geboren in Quierschied / Saar (Deutschland)
1988 – 1992	Grundschule Pater Eberschweiler in Püttlingen
1992 – 2001	Realgymnasium in Völklingen
2001 – 2003	Studium der Veterinärmedizin an der Szent István Universität Budapest (Ungarn)
2003 – 2007	Studium der Veterinärmedizin an der Veterinär- medizinischen Fakultät der Universität Leipzig mit Staatsexamen
Seit 2007	Assistent und Doktorand am Departement für Nutztiere der Universität Zürich.

## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Ueli Braun für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referats und die jederzeit gewährte, freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Ernst Peterhans für die Übernahme des Korreferats und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Virologie der Universität Bern für die virologischen und serologischen Untersuchungen der verschiedenen Proben.

Herrn Prof. Dr. Hans Lutz und seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Veterinärmedizinischen Labors der Universität Zürich für die Durchführung der hämatologischen Untersuchungen.

Frau Dr. Claudia Bachofen für die unterstützende Zusammenarbeit, die stets kompetente Beratung in fachlichen Fragen und die interessanten wie lehrreichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Michael Hässig für die unersetzbare Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Dr. Andreas Tschuor für die Unterstützung und Beratung bezüglich Stallklima und Fütterung.

Frau Dr. Dagmar Kemper-Gisler für ihre Hilfe bei der digitalen Erstellung des Literaturverzeichnisses.

Frau med. vet. Simone Reichle für ihre wertvolle Hilfestellung bei der Auswahl der Tiere sowie Frau med. vet. Katharina Steininger für die Hilfe bei der Blutprobenentnahme in den Herkunftsbetrieben.

Frau cand. med. vet. Franziska Rügsegger, Frau cand. med. vet. Martina Kohler und Frau med. vet. Mareike Becker-Birk für ihre unermüdliche Hilfe bei der Pflege und Versorgung der Tiere.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Helene und Dr. Hans Erich, meinen Grosseltern sowie meinen Geschwistern Hans Peter und Mathias für die liebevolle und stets ermunternde Unterstützung beim Erstellen der Dissertation und zu allen Zeiten.

Meinem Grossvater Emil Butterbach für die prägenden Eindrücke im Umgang mit Grosstieren.

Ich möchte an dieser Stelle meinem verstorbenen Grossvater Dr. Hans Reichert gedenken und ihm für alles danken, was er mit seinem Handeln und seiner Fürsorge bewirkt hat.